

Aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere  
der Justus Liebig-Universität Gießen  
Direktor: Professor Dr. Th. Schliesser  
Abteilung Zoonosen: Professor Dr. H. Krauss

---

Serologische Untersuchungen an Rinder- und  
Schafseren zum Nachweis von gruppenspezifischen  
Chlamydien-Antikörpern unter Verwendung der  
Agargelpräzipitation und der Komplement-  
bindungsreaktion

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
bei dem Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von  
Manfred Breinl  
Tierarzt aus Böhmischem-Kamnitz

Gießen 1973







Aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere  
der Justus Liebig-Universität Gießen  
Direktor: Professor Dr. Th. Schliesser  
Abteilung Zoonosen: Professor Dr. H. Krauss

---

Serologische Untersuchungen an Rinder- und  
Schafseren zum Nachweis von gruppenspezifischen  
Chlamydien-Antikörpern unter Verwendung der  
Agargelpräzipitation und der Komplement-  
bindungsreaktion

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
bei dem Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von  
Manfred Breinl  
Tierarzt aus Böhmischem-Kamnitz

Gießen 1973

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin Gießen

---

Dekan : Prof. Dr. M. Frimmer

Berichterstatter : Prof. Dr. H. Krauss

Tag der mündlichen Prüfung : 17. Dezember 1973



11.11.1911

1. Einleitung  
2. Die Eltern  
3. Die Kindheit  
4. Die Jugend  
5. Die Ehe  
6. Die Kinder  
7. Die Eltern  
8. Die Kindheit  
9. Die Jugend  
10. Die Ehe  
11. Die Kinder  
12. Die Eltern  
13. Die Kindheit  
14. Die Jugend  
15. Die Ehe  
16. Die Kinder  
17. Die Eltern  
18. Die Kindheit  
19. Die Jugend  
20. Die Ehe  
21. Die Kinder  
22. Die Eltern  
23. Die Kindheit  
24. Die Jugend  
25. Die Ehe  
26. Die Kinder  
27. Die Eltern  
28. Die Kindheit  
29. Die Jugend  
30. Die Ehe  
31. Die Kinder  
32. Die Eltern  
33. Die Kindheit  
34. Die Jugend  
35. Die Ehe  
36. Die Kinder  
37. Die Eltern  
38. Die Kindheit  
39. Die Jugend  
40. Die Ehe  
41. Die Kinder  
42. Die Eltern  
43. Die Kindheit  
44. Die Jugend  
45. Die Ehe  
46. Die Kinder  
47. Die Eltern  
48. Die Kindheit  
49. Die Jugend  
50. Die Ehe  
51. Die Kinder  
52. Die Eltern  
53. Die Kindheit  
54. Die Jugend  
55. Die Ehe  
56. Die Kinder  
57. Die Eltern  
58. Die Kindheit  
59. Die Jugend  
60. Die Ehe  
61. Die Kinder  
62. Die Eltern  
63. Die Kindheit  
64. Die Jugend  
65. Die Ehe  
66. Die Kinder  
67. Die Eltern  
68. Die Kindheit  
69. Die Jugend  
70. Die Ehe  
71. Die Kinder  
72. Die Eltern  
73. Die Kindheit  
74. Die Jugend  
75. Die Ehe  
76. Die Kinder  
77. Die Eltern  
78. Die Kindheit  
79. Die Jugend  
80. Die Ehe  
81. Die Kinder  
82. Die Eltern  
83. Die Kindheit  
84. Die Jugend  
85. Die Ehe  
86. Die Kinder  
87. Die Eltern  
88. Die Kindheit  
89. Die Jugend  
90. Die Ehe  
91. Die Kinder  
92. Die Eltern  
93. Die Kindheit  
94. Die Jugend  
95. Die Ehe  
96. Die Kinder  
97. Die Eltern  
98. Die Kindheit  
99. Die Jugend  
100. Die Ehe

MEINEN ELTERN  
IN DANKBARKEIT GEWIDMET

1. Einleitung  
2. Die Eltern  
3. Die Kindheit  
4. Die Jugend  
5. Die Ehe  
6. Die Kinder  
7. Die Eltern  
8. Die Kindheit  
9. Die Jugend  
10. Die Ehe  
11. Die Kinder  
12. Die Eltern  
13. Die Kindheit  
14. Die Jugend  
15. Die Ehe  
16. Die Kinder  
17. Die Eltern  
18. Die Kindheit  
19. Die Jugend  
20. Die Ehe  
21. Die Kinder  
22. Die Eltern  
23. Die Kindheit  
24. Die Jugend  
25. Die Ehe  
26. Die Kinder  
27. Die Eltern  
28. Die Kindheit  
29. Die Jugend  
30. Die Ehe  
31. Die Kinder  
32. Die Eltern  
33. Die Kindheit  
34. Die Jugend  
35. Die Ehe  
36. Die Kinder  
37. Die Eltern  
38. Die Kindheit  
39. Die Jugend  
40. Die Ehe  
41. Die Kinder  
42. Die Eltern  
43. Die Kindheit  
44. Die Jugend  
45. Die Ehe  
46. Die Kinder  
47. Die Eltern  
48. Die Kindheit  
49. Die Jugend  
50. Die Ehe  
51. Die Kinder  
52. Die Eltern  
53. Die Kindheit  
54. Die Jugend  
55. Die Ehe  
56. Die Kinder  
57. Die Eltern  
58. Die Kindheit  
59. Die Jugend  
60. Die Ehe  
61. Die Kinder  
62. Die Eltern  
63. Die Kindheit  
64. Die Jugend  
65. Die Ehe  
66. Die Kinder  
67. Die Eltern  
68. Die Kindheit  
69. Die Jugend  
70. Die Ehe  
71. Die Kinder  
72. Die Eltern  
73. Die Kindheit  
74. Die Jugend  
75. Die Ehe  
76. Die Kinder  
77. Die Eltern  
78. Die Kindheit  
79. Die Jugend  
80. Die Ehe  
81. Die Kinder  
82. Die Eltern  
83. Die Kindheit  
84. Die Jugend  
85. Die Ehe  
86. Die Kinder  
87. Die Eltern  
88. Die Kindheit  
89. Die Jugend  
90. Die Ehe  
91. Die Kinder  
92. Die Eltern  
93. Die Kindheit  
94. Die Jugend  
95. Die Ehe  
96. Die Kinder  
97. Die Eltern  
98. Die Kindheit  
99. Die Jugend  
100. Die Ehe

## INHALTSVERZEICHNIS

|                                                      | Seite |
|------------------------------------------------------|-------|
| I. Einleitung                                        | 1     |
| II. Literatur                                        | 2     |
| 1. Stellung des Erregers im System                   | 2     |
| a. Klassifikation des Erregers                       | 2     |
| b. Nomenklatur des Erregers                          | 2     |
| 2. Charakterisierung der Chlamydien                  | 4     |
| A. Morphologie                                       | 4     |
| a. Lichtmikroskopisch                                | 4     |
| b. Elektronenmikroskopisch                           | 5     |
| c. Biochemisch                                       | 6     |
| B. Chlamydienantigene                                | 7     |
| a. Gruppenspezifisches Antigen                       | 7     |
| b. Typspezifisches Antigen                           | 8     |
| C. Entwicklungszyklus der Chlamydien                 | 9     |
| D. Haltbarkeit                                       | 10    |
| E. Sensibilität gegen Antibiotika<br>und Sulfonamide | 11    |
| F. Züchtung                                          | 12    |
| a. Bebrütetes Hühnerei                               | 12    |
| a1. Dottersack                                       | 12    |
| a2. Chorioallantoismembran                           | 12    |
| a3. Chorioallantoishöhle                             | 13    |
| b. Gewebekultur                                      | 13    |
| 3. Chlamydieninfektionen bei Rind und Schaf          | 15    |
| A. Latente Infektionen                               | 15    |
| B. Krankheiten                                       | 17    |
| a. Intestinale Chlamydieninfektionen                 | 17    |
| b. Bronchopneumonien                                 | 18    |
| c. Chlamydienabort                                   | 19    |

|                                                                           | Seite |
|---------------------------------------------------------------------------|-------|
| d. Sporadische bovine Encephalomyelitis                                   | 20    |
| e. Polyarthrititis                                                        | 20    |
| f. Konjunktivitis                                                         | 21    |
| g. Mastitis                                                               | 22    |
| h. Genitale Chlamydieninfektionen                                         | 23    |
| 4. Antigenherstellungsverfahren                                           | 24    |
| A. Gruppenspezifisches Antigen                                            | 24    |
| a. Kochantigen                                                            | 24    |
| b. Behandlungsverfahren mit Trypsin,<br>Phenol, Äther, Azeton und Alkohol | 24    |
| c. Antigenherstellung durch Natrium-<br>laurylsulfatbehandlung            | 25    |
| d. Antigenherstellung durch Natrium-<br>desoxycholatbehandlung            | 25    |
| B. Stammspezifisches Antigen                                              | 26    |
| 5. Serologische Nachweismethoden                                          | 27    |
| A. Komplementbindungsreaktion                                             | 27    |
| B. Präzipitationstest                                                     | 28    |
| C. Andere serologische Nachweismethoden                                   | 32    |
| a. Agglutinationstest                                                     | 32    |
| b. Neutralisationstest                                                    | 32    |
| c. Hämagglutinationshemmungstest                                          | 32    |
| d. Indirekter Hämagglutinationstest                                       | 32    |
| e. Immunofluoreszenz-Test                                                 | 33    |
| III. Eigene Untersuchungen                                                | 34    |
| 1. Material und Methode                                                   | 34    |
| A. Erregerstamm                                                           | 34    |
| B. Untersuchungsmaterial                                                  | 34    |
| C. Vermehrung des Chlamydienstammes                                       | 36    |

|                                                                                | Seite |
|--------------------------------------------------------------------------------|-------|
| D. Methodik des Erregernachweises                                              | 37    |
| a. Direkter mikroskopischer Nachweis                                           | 37    |
| b. Indirekter Nachweis einer Chlamydien-<br>infektion durch serologische Tests | 37    |
| E. Antigenherstellung                                                          | 37    |
| a. Kochantigenherstellung                                                      | 37    |
| b. Behandlung durch Ultraschall                                                | 38    |
| c. Methodik der Frigen-Behandlung                                              | 38    |
| d. Methodik der Natriumlaurylsulfat-<br>behandlung                             | 38    |
| e. Methodik der Natriumdesoxycholat-<br>behandlung                             | 39    |
| F. Methodik der Durchführung der KBR                                           | 41    |
| G. Methodik des Agargelpräzipitations-<br>testes                               | 43    |
| 2. Untersuchungsergebnisse                                                     | 47    |
| A. Ergebnisse der Antigenherstellung                                           | 47    |
| B. Ergebnisse in der KBR                                                       | 53    |
| C. Ergebnisse im Agargelpräzipitationstest                                     | 58    |
| a. Erprobung der optimalen Technik                                             | 58    |
| b. Testergebnisse                                                              | 60    |
| IV. D i s k u s s i o n                                                        | 63    |
| V. Z u s a m m e n f a s s u n g                                               | 71    |
| VI. L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s                                    | 73    |

## I. Einleitung

Eine Vielzahl von Forschungsarbeiten hat sich in den letzten Jahren mit der Erregergruppe der "Chlamydien" befaßt; eine umfangreiche Monographie (Storz 1971) wurde der Biologie dieser Mikroorganismen und der durch sie hervorgerufenen Krankheiten gewidmet. Neben den klassischen Infektionen wie der Psittakose, des Trachoms, des Lymphogranuloms und der Einschlußkörperchen-Konjunktivitis des Menschen sowie des enzootischen Abortes der Schafe wurden bei Mensch und Tier weitere Krankheiten bekannt, deren Ursache auf Chlamydien zurückzuführen ist bzw. bei deren Entstehung Chlamydien zumindest beteiligt sind. Hinzu kommen neue Erkenntnisse über das Vorkommen der für Chlamydien charakteristischen latenten Infektionen und über sog. "apathogene" oder "fakultativ pathogene" Stämme, die vor allem bei Wiederkäuern isoliert wurden.

In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst ein kurzer Abriß über Chlamydien unter besonderer Berücksichtigung der neueren Literatur gegeben und über die verschiedenen Erscheinungsformen von Chlamydieninfektionen bei Wiederkäuern berichtet werden.

Des weiteren sollte die Verwendbarkeit der Agargelpräzipitation für die Diagnose von Chlamydiosen erprobt und in Verbindung mit der Komplementbindungsreaktion seroepidemiologische Untersuchungen an Rinder- und Schafseren durchgeführt werden.

## II. Literatur

### 1. Stellung des Erregers im System

#### a. Klassifikation des Erregers

Die Klassifikation des Erregers war lange umstritten. Levinthal (1930), Bedson u. Western (1930) u.a. ordneten die Erreger noch unter die Viren ein; Lillie (1930), Rake u.M. (1953) rechneten sie zu den Rickettsien. 1964 und 1966 belegte Moulder eindeutig die Zugehörigkeit der Chlamydien zu den Bakterien. Diese Untersuchungsergebnisse wurden von Page (1966 u. 1968) und Weiss (1968) untermauert. Moulder (1964 u. 1968) sowie Stelzner u.M. (1970 u. 1973) sprachen von "endoparasitischen Bakterien" und Weiss (1968) von "wirtsabhängigen Bakterien".

1968 stimmte das 'Subcommittee on Chlamydiaceae of the Taxonomy Committee of the American Society for Microbiology' der Zuordnung zu den Bakterien, die ausschließlich auf morphologischen und biochemischen Erkenntnissen basierte, zu.

#### b. Nomenklatur des Erregers

Die Nomenklatur des Erregers war lange Zeit uneinheitlich. Man sprach von Erregern der Psittakosis-Lymphogranuloma-venereum-Gruppe (Durand u.M. 1913), von Miyagawanella (Brumpt 1938), von Bedsonia (Meyer 1942), von Chlamydia (Jones, Rake u. Stearns 1945), von Neorickettsia (Goret 1961) und Rakeia (Levaditi u.M. 1964).

In der siebten Ausgabe von Bergey's Manual of Determination Bacteriology (Breed u.M. 1957) wird die Einteilung

Familie Chlamydiaceae

Gattung Chlamydia

vorgenommen.

Rake schlug 1953 fünf verschiedene Gattungen vor, aber Page forderte 1966 aufgrund der gleichen Morphologie, des gleichen Entwicklungszyklus und des gleichen Gruppenantigens der

verschiedenen Erreger die Einführung einer Gattung Chlamydia.

Unterschiede innerhalb dieser Gattung führten dazu, daß Gordon u. Quan (1965) sowie Lin u. Moulder (1966) die Einteilung in zwei Gruppen (Subgruppe A und B) empfahlen.

Page (1968) schlug die Unterteilung der Gattung Chlamydia in zwei Gruppen Chlamydia trachomatis und Chlamydia psittaci aufgrund folgender Eigenschaften vor :

Chlamydia trachomatis-Stämme entwickeln sich innerhalb von Zytoplasmavesikeln in kompakten, glykogenproduzierenden Mikrokolonien. Erst im späteren Verlauf der Infektion platzen diese Vesikel. Das Wachstum der Erreger wird durch Sulfadiazin in dem Maße gehemmt, in dem die eigene Folatsynthese für den Erreger essentiell ist.

Chlamydia psittaci-Stämme entwickeln sich ubiquitär im Zytoplasma der Wirtszelle, weil die zunächst ebenfalls vorhandene Vesikelmembran schon frühzeitig, zu Beginn der Vermehrung, platzt (Officer u. Brown 1960). Glykogen wird nicht produziert. Die eigene Folatsynthese ist nicht essentiell, deshalb wird das Wachstum der Erreger durch Sulfadiazin nicht gehemmt (Cutlip u.M. 1972).

Diese Einteilung ist heute allgemein gebräuchlich.

Storz schlug 1971 wegen der Einmaligkeit des Entwicklungszyklus der Chlamydien die Einführung einer neuen Gattung Chlamydiales unter Berufung auf Moulder (1964) und Weiss (1968) vor.

## 2. Charakterisierung der Chlamydien

### A. Morphologie

#### a. Lichtmikroskopisch

Als die beiden Hauptformen der Chlamydien werden die kleinen, infektiösen Formen, die Elementarkörperchen (EK) oder "elementary bodies" und die großen, nichtinfektiösen Formen, "reticulate" oder "initial bodies" angesehen. Nach Stelzner u.M. (1970) sind dies keine eigenständigen Formen, sondern Glieder einer Transformations- bzw. Entwicklungsreihe, zu denen noch "giant bodies", "intermediate forms" und andere Strukturen hinzukommen.

Die Elementarkörperchen sind basisch anfärbbar und im Lichtmikroskop als staubartige, kleine, runde Körperchen sichtbar.

Die gebräuchlichste Färbemethode ist die Stamp-Färbung.

In der folgenden Tabelle sind die bekanntesten Färbemethoden zusammengestellt :

| Färbung      | Anfärbbarkeit |          |
|--------------|---------------|----------|
|              | Erreger       | Umgebung |
| Stamp        | rot           | grün     |
| Giemsa       | rötlich-blau  | hellrot  |
| Macchiavello | rot           | hellblau |
| Castaneda    | blau          | rot      |

Auf färberische Unterschiede zwischen Schaf- und Vogelchlamydien und bovinen Chlamydien wies außer Schoop u.H. (1965) und Storz u. McKercher (1962) auch Schoene (1971) hin. Abweichend von den bei der Stamp-Färbung scharf abgegrenzten,

kräftig rot gefärbten, runden Körperchen des Schafabortes oder der Psittakose, fand er beim Rind meist nur "verdächtige" Körperchen, die nicht alle und nicht vollständig rot gefärbt waren, sondern oft blau-rötlich erschienen. Sie waren etwas größer als Schaf-Chlamydien und häufig nicht scharf konturiert.

#### b. Elektronenmikroskopisch

Untersucht man Chlamydien-Präparationen mit dem Elektronenmikroskop, dann sind die kleinen infektiösen Formen der Chlamydien (C.), die "elementary bodies", zwischen 220-300 nm groß und morphologisch heterogen. Sie zeigen einen zentral gelegenen, homogenen elektronendichten Kern, der auch exzentrisch liegen und unterschiedlich strukturiert sein kann.

Die großen, nichtinfektiösen Chlamydienformen, die "reticulate bodies" werden zwischen 500-1000 nm groß (Tamura u.M. 1967) und erscheinen in bedampften Präparationen als flache, runde Gebilde bis zu einer Größe von 1600 nm. In Schnittpräparaten sind die Partikel mit ribosomenähnlichen Granula gefüllt.

Übergänge zwischen "elementary bodies" und "reticulate bodies" werden ebenfalls beobachtet.

Beide Chlamydienformen besitzen als Umhüllung zwei Einheitsmembranen, die sich im Elektronenmikroskop bei mäßiger Vergrößerung als zwei dunkle Linien darstellen. Tamura u.M. (1971) sprechen von einer äußeren oder Zellmembran und von einer inneren oder Zytoplasmamembran. Sie beschreiben bei den EK die äußere Membran als eine glatte, feste Struktur, die in 0,5 % Natriumdesoxycholat nicht löslich ist und die innere Membran als in der Form unregelmäßig und in 0,5 % Natriumdesoxycholat löslich. Im Gegensatz zu den Membranen der EK ist bei den "reticulate bodies" nur die äußere Membran

deutlich sichtbar. Sie ist unlöslich in Natriumdesoxycholat und der Zellwand der EK ähnlich, obwohl sie offensichtlich nicht gleich stabil ist. Die innere Membran, die verschiedentlich in Bruchstücken sichtbar ist, ist natriumdesoxycholatlöslich. Tribby (1970) berichtet von einer dünnen, glatten Zellwand bei "reticulate bodies" und einer festen, gefalteten Zellwand bei EK, die bei beiden aus zwei "trilamellären" Membranen bestehen.

Tanami u. Yamada (1973) beschrieben kürzlich das gelegentliche Auftreten von "miniature reticulate bodies" während des Entwicklungszyklus von *C.psittaci* in L-Zellen. Es handelte sich dabei um ca. 200 nm große Körper, die in ihrer Struktur den "reticulate bodies" gleichen, bei denen jedoch deutlich zwei Einheitsmembranen erkennbar waren. Sie entstanden durch Knospung von "reticulate bodies" ähnlich der Vermehrung von Mycoplasmen. Die Anwesenheit von Penicillin bewirkte die vermehrte Bildung dieser Körper bereits in einer Konzentration von 0,1 µg/ml Medium.

### c. Biochemisch

Neuere Erkenntnisse auf dem Gebiet der Biochemie wie z.B. das gleichzeitige Vorkommen von DNS und RNS, der inhibierende Effekt von Penicillin, die Möglichkeit der zellunabhängigen Folatsynthese bei *C.psittaci*, die Reversion der D-Cycloserin-Inhibition durch D-Alanin und das Vorkommen von Muraminsäure und Diaminopimelinsäure-Decarboxylase trugen zur Klassifizierung der Chlamydien als Bakterien bei (Stelzner u.M. 1970).

Grundlegende Untersuchungen über die chemische Zusammensetzung des gruppenspezifischen Antigens stellten Benedict u.M. (1955 u. 1956) an. Sie unterschieden eine phenolunlösliche,  $\text{KIO}_4$ -empfindliche Fraktion, die chemisch ein Lipopolysaccharid ist und ein Protein als phenollösliche,  $\text{KIO}_4$ -resistente Fraktion. Dhir u.M. (1971 u. 1972) sahen

in dem Polysaccharidanteil, der chemisch aus 2-keto-3-Hydroxy-octansäure und einem glykosidisch daran gebundenen neutralen Polysaccharid besteht, die komplementbindende, gruppenspezifische Komponente des Antigens sowohl in der Komplementbindungsreaktion (KBR) als auch im Präzipitationstest.

## B. Chlamydienantigene

### a. Gruppenspezifisches Antigen

Alle Chlamydien (*C.psittaci* und *C.trachomatis*) besitzen ein gemeinsames, gruppenspezifisches Antigen (Kölbl 1967, Collins u. Barron 1970, Storz 1971). Es ist hitzestabil und perjodatempfindlich. Gewinnen kann man es durch Kochen der rohen oder teilweise gereinigten Chlamydien suspension und durch Extraktion mittels Natriumdesoxycholat, Natriumlaurylsulfat, Säure, Lauge, Diethyläther sowie durch Beschallung der ganzen Partikel (Barron u. Collins 1967, Gyulai u.M. 1969).

Es ist mit folgenden Methoden nachweisbar :

Komplementbindungsreaktion (Bedson 1936)

Indirekte Komplementbindungsreaktion (Hillmann u.M. 1951,  
Page u. Bankowski 1960)

Agglutination (Labzoffsky 1946, Mason 1959)

Hämagglutinationshemmungstest (Hillmann u.M. 1951, Gogolak  
u. Ross 1955)

Agargelpräzipitationstest (Collins u. Barron 1970)

Immunofluoreszenz (Collins u. Barron 1970, Eugster u.M.  
1970)

Schon 1956 hatten Benedict u. O'Brian nach Natriumlaurylsulfatbehandlung zwei gruppenspezifische phenollösliche Partialantigene demonstriert; das eine war perjodatempfindlich, das andere perjodatenempfindlich.

Barron u.M. (1972) fanden bei der immunelektrophoretischen Untersuchung eines Natriumdesoxycholatesextraktes eines C.trachomatis-Stammes zwei gruppenspezifische Partialantigene, die beide perjodatempfindlich waren. Kuo u.M. (1971) berichteten von drei gruppenspezifischen Antigenen, zwei wurden im Natriumdesoxycholatesextrakt demonstriert, ein weiteres in der Zellwandpräparation. Eines der durch Natriumdesoxycholat extrahierten Antigene war ein Lipid-Karbohydrat-Komplex.

Gogolak (1954) beschrieb auch als gruppenspezifisch ein hämagglutinierendes Antigen. Über das Auftreten eines löslichen Hämagglutinins im Verlauf der Chlamydienvermehrung berichteten Hillmann u.M. (1951) bei der Züchtung eines Meningopneumonitis-Stammes in der Allantoisflüssigkeit embryonierter Hühnereier. Inaba u.M. (1958), Henneberg u.M. (1966) und Hencner u. Parnas (1967) folgten mit gleichen Untersuchungsergebnissen bei anderen Chlamydien-Stämmen.

Grimes u.M. (1970) machten genaue Angaben über die Gewinnung des hämagglutinierenden Antigens, wie auch Riera u. Barron (1970), die dieses Antigen für den Agargelpräzipitationstest verwendeten.

Das Hämagglutinin ist wenig stabil. Es verschlechtert sich schon nach kurzer Lagerung und ist daher für die Verwendung bei Routineuntersuchungen wenig geeignet. Chemisch scheint es aus einem Lecithin-DNS-Protein zu bestehen (Storz 1971).

#### b. Typspezifisches Antigen

Bedson u.M. berichteten 1949 als erste über typspezifische Chlamydienantigene, die hitzelabil waren und zur Differenzierung der Chlamydien benutzt werden konnten.

Jenkin u.M. (1960) wiesen bei der Extraktion des Gruppenantigens vom Meningopneumonitis- und Feline Pneumonitis-Stamm

mittels Natriumdesoxycholat zusätzlich in den Zellwandbruchstücken große Mengen eines typspezifischen Antigens mit komplementbindenden Eigenschaften nach, das durch längeres Beschallen der mit Natriumdesoxycholat vorbehandelten Partikel gewonnen wurde. Dieses Antigen war hitzestabil und  $\text{KIO}_4$ -resistent. Alle anderen bisher beschriebenen typspezifischen Antigene waren  $\text{KIO}_4$ -resistent aber hitzelabil (Storz 1971).

Die typspezifischen Antigene sind mit folgenden Methoden nachweisbar :

- |                            |                    |
|----------------------------|--------------------|
| Komplementbindungsreaktion | (Terzin u.M. 1964) |
| Indirekte Hämagglutination | (Vedros 1967)      |
| Agargeldiffusionstest      | (Barron u.M. 1972) |

### C. Entwicklungszyklus der Chlamydien

Moulder wies 1964 auf die Tatsache hin, daß es keine Parallele zum Entwicklungszyklus der Chlamydien bei anderen Bakterien gibt. Die Tochterzellen aller anderen Bakterien sind infektiös und besitzen Merkmale der Elternzellen; dies ist bei den Chlamydien nicht der Fall.

Die infektiösen EK werden von der Wirtszelle durch Phagozytose aufgenommen und liegen dann von einer Membran umgeben, die von der Zellmembran stammt, in einer Zytoplasmablase. Hierin entwickeln sie sich zu den großen "reticulate forms", die nichtinfektiös sind und sich durch Zellteilung vermehren. Während der zweiten Phase der Reorganisation entstehen in immer größerem Ausmaß über Zwischenformen kleine Chlamydienformen mit dichtem Zentrum ("elementary bodies"), die infektiös sind und sich nicht mehr teilen (Moulder 1964).

Die Bildung der intrazellulären Mikrokolonien der C.psittaci-Stämme, die meist alle Formen des Entwicklungszyklus enthalten, dauert zwischen 17 und 48 Stunden und ist abhängig vom

Chlamydienstamm, von der Temperatur der Inkubation und der Anfälligkeit der Wirtszelle (Cutlip u.M. 1972).

Durch den Zerfall der Zelle werden schließlich die EK frei, die wieder andere Wirtszellen infizieren können (Litwin 1959, Moulder 1962, 1964, 1969, Higashi 1964, Stelzner u.M. 1970).

#### D. Haltbarkeit

Chlamydien sind über längere Zeit - auch bei tiefen Temperaturen - wenig haltbar. Extrazellulär überleben lediglich Elementarkörperchen wegen ihrer rigiden Zellwand, im Gegensatz zu den großen Formen.

Weiss u. Dressler (1962) untersuchten einen Stamm von *C. trachomatis*, der bei Aufbewahrung in einer gereinigten Dottersacksuspension bei  $+35^{\circ}\text{C}$  in den ersten 12 h nur langsam, in den folgenden 24 h aber dann rapide an Infektiosität verlor.

Nach Kraljevic (1968), der einen *C. ovis*-Stamm in unverdünnter Amnioallantoisflüssigkeit einem Haltbarkeitsversuch bei einer Lagertemperatur von  $-70^{\circ}\text{C}$  über mehrere Monate hinweg unterzog, kam es in den ersten sieben Wochen nur zu einem geringen Infektiositätsverlust, während dann bis zur 36. Woche eine Senkung der  $\text{ID}_{50}$ -Aktivität um 99,99 % eintrat. Die  $\text{LD}_{50}$ -Aktivität war schon bis zur 15. Woche um 99,99 % gesunken. Daraus ergab sich die Forderung einer nur kurzfristigen Aufbewahrung von Chlamydien bei  $-70^{\circ}\text{C}$  in Amnioallantoisflüssigkeit als Suspension. Zur längeren Erhaltung schlugen Weiss u. Dressler (1962) die Aufbewahrung bei pH 7,0 - 7,4 in 0,02 M Phosphatpuffer unter Zusatz von 0,4 M Sucrose vor. Storz empfahl 1971 den Zusatz von Rinderalbumin in einer Konzentration von 1,8 mg pro ml gereinigte Dottersacksuspension. Nitzschke u. Rott beobachteten schon 1957 eine gesteigerte Überlebensdauer von Chlamydien in der Allantoisflüssigkeit bei  $-4^{\circ}\text{C}$  oder  $+18^{\circ}\text{C}$  nach Zugabe von 0,5 % Cystein.

### E. Sensibilität gegen Antibiotika und Sulfonamide

Viele Chemotherapeutika beeinflussen die Infektiosität und Vermehrung der Chlamydien nicht. Man macht sich dies zunutze, indem man diese Mittel gegen bakterielle Sekundärinfektionen einsetzt oder sie zur Isolierung von Chlamydien aus klinischem Material verwendet. Zu diesem Zweck sollten immer zwei Mittel zur Anwendung gelangen, das eine gegen gram-negative das andere gegen gram-positive Bakterien. Als Beispiel sei Streptomycin und Vancomycin genannt. Streptomycin wirkt gegen gram-negative Bakterien und wird in einer Konzentration von 500 ng/ml verwendet. Selbst Dosen über 10 000 ng/ml haben keinen Einfluß auf die Chlamydienvermehrung. Vancomycin hat nach Jenkin u. Hung (1967) bei einer Konzentration von 2 mg pro Hühnerembryo oder 800 ng/ml Zellkultur keine hemmende Wirkung auf das Chlamydienwachstum, wirkt aber gegen gram-positive Bakterien. 100 ng/ml Medium wird als Gebrauchskonzentration angegeben.

Gegen Penicillin sind Chlamydien in verschieden starkem Maße empfindlich; geringe Dosen rufen jedoch noch keine Aktivitätsminderung hervor. Detaillierte Untersuchungen über die Einwirkung von Penicillin auf die Vermehrung von Chlamydien liegen von Tamura u. Manire (1968), von Moulder (1969), von Tribby (1970) und von Matsumoto u. Manire (1970) vor. Penicillin verhindert nicht die Entwicklung von "reticulate bodies", jedoch deren Differenzierung in "elementary bodies".

Starken hemmenden Effekt besitzen die Tetrazyklinderivate, wie Hostazyklin, Reverin und besonders Chlortetrazyklin, ebenso Chloramphenicol. Sie greifen am Anfang des Entwicklungszyklus hemmend ein. So hemmen Chloramphenicol und Rifampicin die Reorganisation von kleinen Chlamydienformen in große und die Vermehrung der großen Zellen durch Zellteilung (Tribby u.M. 1973).

Sulfonamide verhindern den Einbau von p-Aminobenzoesäure in Folsäure. Die verschiedenen Chlamydien lassen sich hinsichtlich ihres Verhaltens gegenüber Sulfonamiden in zwei Gruppen einteilen (siehe Kapitel II/1b).

Die Stämme von *C. trachomatis*, die auch Glykogenproduktion bewirken, sind hochempfindlich gegen D-Cycloserin, während die Stämme von *C. psittaci* mehr resistent sind und keine Glykogenproduktion verursachen (Lin u. Moulder 1966). Der Grad der D-Cycloserin-Empfindlichkeit entspricht der Gruppeneinteilung von Gordon u. Quan (1965).

## F. Züchtung

### a. Bebrütetes Hühnerei

#### a1. Dottersack

Als erste berichteten 1940 Rake u.M. über die Vermehrung von Chlamydien in den Dottersackzellen embryonierter Hühnereier. Stamp (1950 u. 1951) und Mitscherlich (1955) folgten mit Untersuchungen, die eine deutliche Affinität der Chlamydien zu den Entodermalzellen des Dottersackes zeigten. Die Embryonen sterben 3 - 13 Tage p.i., wobei der Zeitpunkt des Todes der Embryonen im linearen Verhältnis zur Chlamydien-Konzentration im Inokulum steht (Crocker u. Bennet 1955, Reeve u. Taverne 1967).

#### a2. Chorioallantoismembran (CAM)

Die Übertragung von Chlamydien auf die CAM gelang Stamp (1951) und Mitscherlich (1954).

Das Vermögen, sich auf der CAM zu vermehren, ist bei den einzelnen Chlamydien-Stämmen sehr unterschiedlich. Die meisten Stämme wachsen hier nur schlecht und auch nur nach sorgfältiger Adaptation (Mariott u. Storz 1966).

Yalpa (1959) fand auf der CAM infizierter Hühnerembryonen stecknadelkopfgroße, weiße Herde mit Ödembildung. Mariott u. Storz (1966) beschrieben kleine, pockenähnliche Läsionen auf der CAM, sowie Ödeme in der Membran.

### a3. Chorioallantoishöhle

Schon 1945 berichteten Francis u. Gordon über die Vermehrung von Chlamydien in den Zellen der CAM, von denen dann die Chlamydien in die Allantoisflüssigkeit (ALF) freigesetzt wurden.

1962 gelang es Wachendörfer u. Peheim nach optimaler Adaptation in der 89. Dottersackpassage einen Chlamydienstamm in der Allantoishöhle zu züchten. Die Vermehrung hierin brachte erhebliche Vorteile :

1. Die Chlamydienausbeute ist erheblich höher, die ALF fällt in größeren Mengen an.
2. Die Materialentnahme ist technisch einfach und daher die Gefahr der bakteriellen Kontamination geringer.
3. Das Material ist frei von N-haltigen Dottersackbestandteilen, die bei der Antigenherstellung störend wirken können (Roots u. Rott 1958).
4. Die ALF erlaubt eine bessere Färbung der Chlamydien und somit eine einfachere mikroskopische Auswertung der Präparate.

### b. Gewebekultur

Die Vermehrung von Chlamydien im Dottersack embryonierter Hühnereier ist eine zuverlässige Methode zur Isolierung und Züchtung dieses Erregers, aber diese Methode ist wenig geeignet für exakte quantitative und biochemische Studien.

Gewebekulturmethoden liefern bessere Bedingungen für die Untersuchungen von Chlamydieninfektionen auf Zellebene (Storz 1971).

Versuche, die Gewebekultur bei Studien über Chlamydien zu verwenden, gehen auf die Arbeit von Bland u. Conti (1935) zurück. Das Verhalten von Chlamydien gegenüber den verschiedensten Wirtszellen wurde danach von vielen Forschern untersucht. Neuere Berichte liegen vor von Morrison u. Jenkin (1972), Harrison (1972), Kuo u.M. (1972), Friis (1972), Blyth u. Taverne (1972), Evans (1972) u.a. .

Eine ausführliche Zusammenstellung der wichtigsten Ergebnisse liefert Storz (1971).

### 3. Chlamydieninfektionen bei Rind und Schaf

Die weitaus größte Zahl der Berichte über Chlamydieninfektionen liegt aus den USA (Storz 1962, 1963, 1966, 1969, McHercher 1968, Page 1973 u.a.) vor. In neuerer Zeit kommen aber auch Untersuchungen aus Europa gehäuft zur Veröffentlichung (Blanco Loizelier 1968 u. 1971, Kölbl 1967 u. 1968, Schoene 1971, Woernle 1973 u.a.).

#### A. Latente Infektionen

Latente Chlamydieninfektionen sind inapparente Infektionen, bei denen sich die Chlamydien in einem potentiell virulenten Stadium im Wirt befinden. Es kommen neben infektiösen Formen auch nichtinfektiöse Chlamydienformen in den latent infizierten Tieren vor. Zwischen Wirt und Erreger besteht bei der latenten Infektion ein Gleichgewichtszustand; es kommt nicht zu einer Beeinträchtigung des Gesundheitszustandes des Wirtsorganismus.

Chlamydieninfektionen liegen häufig in latenter Form bei Mensch und Tier vor.

York u. Baker konnten 1951 als erste Chlamydien aus dem Kot klinisch gesunder Kälber isolieren. Ihnen folgte eine große Anzahl von weiteren Autoren (siehe Storz 1971), die sich mit inapparenten Chlamydieninfektionen vor allem beim Rind befaßten. Neueste Untersuchungen liegen von Eugster u. Storz (1971), St.Georgè (1971), Storz u.M. (1969 u. 1971), Page u.M. (1973) und Smith u.M. (1973) vor.

Die Verfasser stellten vor allem intestinale Chlamydieninfektionen bei klinisch gesunden Kälbern und Rindern bzw. Schafen fest oder fanden wie Omori u.M. (1960) und Popovici (1964) gelegentlich Tiere mit leichten Pneumonien oder Pneumoenteritiden. York u. Baker (1951) ermittelten Befallsraten

in Rinderherden von 60 %, Page u.M. (1973) zwischen 50 und 85 %. Yilmaz u. Mitscherlich (1973) isolierten aus dem Kot von Schafen Chlamydien-Stämme, die keine Verwandtschaft mit Schafabort-Stämmen aufwiesen, die aus Tieren der gleichen Herde isoliert worden waren. Popovici u.M. (1966) stellten bei klinisch gesunden als auch bei kranken Kälbern eine weite Verbreitung von Chlamydien fest und zogen daraus die Folgerung, daß Chlamydien in Verbindung mit anderen Krankheitserregern, z.B. Mycoplasmen, oder mit unspezifischen Faktoren Erkrankungen hervorrufen können, die sonst nicht zum Ausbruch gekommen wären oder zumindest nicht so dramatisch verlaufen wären. Storz u.M. (1971) sahen neben der Virulenz des Erregers auch im Alter der Tiere einen wichtigen Faktor in der Chlamydien-Wirt-Wechselwirkung. Hierfür spricht auch eine Untersuchung von Page u.M. (1973). Sie isolierten einen C.psittaci-Stamm (NADL-1) aus dem Kot gesunder Rinder bzw. Färsen, der avirulent für Schweine, Puten und Laboratoriumstiere war, nicht jedoch für neugeborene Kälber, denen die Kolostralmilch vorenthalten wurde (Smith u.M. 1973). Dieser Stamm stimulierte beim Rind einen Titeranstieg im Serum und erschwerte dadurch die Diagnose von echten Chlamydienerkrankungen. Gegensätzlich hierzu war das Ergebnis bei Färsen, die ständig Chlamydien ausschieden, aber serologisch negativ reagierten.

Die latente Chlamydieninfektion ist epidemiologisch von Bedeutung, da die Tiere Chlamydien über eine längere Zeit mit dem Kot ausscheiden und bei Kontakt mit anderen Tieren hierdurch eine Verbreitung der Infektion möglich ist.

Kölbl (1967) beschrieb aus Kot isolierte Stämme, die eine geringe Pathogenität besaßen, mit denen jedoch nach oraler oder intramuskulärer Verabreichung Krankheitssymptome bei Rindern hervorgerufen werden konnten.

Latente Chlamydieninfektionen bei Schafen beschrieben Kawakami u.M. (1958). Storz u. Thornley (1966) stellten bei natürlich infizierten Schafen ein intermittierendes Ausschei-

den von Chlamydien über mehrere Jahre hindurch fest. Bei Untersuchungen über die Pathogenität von Kotstämmen konnte Storz (1963) experimentell bei Schafen Aborte auslösen, indem er den Tieren intramuskulär Chlamydien injizierte, die er aus ihrem Kot isoliert hatte. Storz u. Thornley (1966) stellten eine Antigengleichheit dieses Abort- und Kotstammes fest. Demgegenüber stehen Untersuchungen von Wilson u. Dungworth (1963), die keine Identität von Kot- und Schaf-abortstämmen nachweisen konnten.

## B. Krankheiten

Chlamydien werden als Ursache von zahlreichen Krankheiten beschrieben, die sich besonders im Respirations- und Digestionstrakt, im ZNS, am Auge, in den Gelenken und in den Geschlechtsorganen manifestieren.

Die Chlamydieninfektionen des Rindes sind oft durch mehrere gleichzeitig vorkommende Organmanifestationen, wie z.B. Pneumonie, Enteritis und Keratokonjunktivitis, gekennzeichnet, wobei jedoch klinisch meist ein Symptom vorherrscht (Winter u.M. 1970).

### a. Intestinale Chlamydieninfektionen

Neben der häufig klinisch latenten Form bei Rindern rufen Chlamydien besonders bei Jungtieren Enteritiden mit hohem Fieber hervor. Nicht selten tritt dabei Diarrhoe in verschieden schwerem Ausmaß bis zu Blutstühlen auf. Anorexie und Tod können die Folgen sein (Kölbl 1967).

Besonders in Verbindung mit anderen Krankheitserregern, wie z.B. *Escherichia coli*, können Chlamydien - abhängig von ihrer Virulenz - erhebliche Erscheinungen bis zur Systemerkrankung hervorrufen.

Chlamydien-Enteritiden treten häufig gleichzeitig mit Aborten, Pneumonien und Polyarthritiden auf.

Doughri u.M. (1973 u. 1973) untersuchten elektronenmikroskopisch die Zellen des Magen-Darm-Traktes nach einer Chlamydieninfektion und stellten fest, daß in erster Linie Epithelzellen, aber auch Zellen der tiefergelegenen Schichten infiziert werden. Die Chlamydien werden durch "Endozytose" von den Zellen aufgenommen. Die Vermehrung erfolgt in der supranukleären Region dieser Zellen, die schließlich degenerieren. Die Chlamydien gelangen auf diese Weise in das Darmlumen sowie in die Lamina propria. Über das lymphatische System kann es schließlich zur Chlamydiaemie und Besiedlung von weiteren Organen kommen.

#### b. Bronchopneumonie

1952 beschrieben in Japan Kiushi u. Inaba bei Rindern und in den USA McKercher bei Schafen Pneumonien, die durch Chlamydien verursacht wurden.

Matumoto u.M. (1955) isolierten den Erreger in Japan bei erkrankten Importrindern aus Australien, Neuseeland und den USA mit den Symptomen Fieber, Husten und Nasenausfluß. Es folgten Berichte aus Deutschland von Schoop (1962) und Nitzschke u.M. (1971) und aus den USA von White (1965), Wilson u. Thompson (1968), Storz (1968) und McKercher (1968) über das Auftreten von Chlamydien-Pneumonien.

Kälber, die im Gegensatz zu älteren Rindern häufiger erkrankten, hatten bei der meist vorkommenden gemäßigten Form Fieber, Nasenausfluß und Husten. Sie genasen nur langsam und blieben dadurch oft erheblich im Wachstum und Gewicht zurück (Winter u.M. 1970). Der schwere Krankheitsverlauf war gekennzeichnet durch Konjunktivitis, Dyspnoe und Diarrhoe (Palotay u. Christensen 1959). Die Kälber wurden im fortgeschrittenen Stadium lethargisch und starben (Storz 1968).

Die Chlamydien-Bronchopneumonie zeigte bei natürlicher Infektion in der Regel einen leichten Verlauf. Lag aber eine bakterielle Sekundärinfektion vor, konnte starker mukopurulenter Nasenausfluß, Speicheln und Tod durch Ersticken beobachtet werden (Storz 1971).

Krauss u.M. (1971) berichteten über die weite Verbreitung von Chlamydien in den Schafherden Kenias und wiesen auf das nicht zu unterschätzende epizootische Problem hin. Ähnliche Beobachtungen machten Gössler u.M. (1973) bei der Untersuchung von Rinderseren aus Kenia. Sie stellten bei 48 % der routinemäßig untersuchten Rinder Chlamydien-Antikörper fest.

### c. Chlamydienabort

Chlamydien als Abortursache beschrieben als erste Stamp u.M. (1950) beim Schaf und Schoop u. Kauker (1956) beim Rind. Storz u.M. (1960) gelang die Chlamydienisolierung beim Rinderabort.

Kühe verwarfen meist während des 7. - 9. Trächtigkeitsmonats, konnten aber auch früher abortieren. Die Aborte traten ganz plötzlich auf, während der Trächtigkeit waren keine Krankheitssymptome zu erkennen. Die Kälber wurden tot geboren oder sie starben in den ersten Tagen nach der Geburt. Plazentaretentionen, Fertilitätsstörungen, Endometritiden (Schoene 1971 und Blanco Loizelier 1971) und erheblicher Milchrückgang (Schoop u. Kauker 1956) wurden beobachtet.

Wie die Kühe abortierten auch Mutterschafe, ohne daß während der Trächtigkeit Krankheitssymptome festzustellen waren. Nur bei experimentell infizierten Tieren konnte man eine 3 - 5 Tage lange Fieberperiode ermitteln; das sonstige Verhalten war nicht gestört (Storz 1963, Novilla 1970).

Beim ersten Kontakt mit Chlamydien verwarfen in einer Schafherde 1/3 der trächtigen Tiere, meist im letzten Monat der Trächtigkeit (Stamp u.M. 1950, Young u.M. 1958).

Es abortierten Tiere jeden Alters, aber besonders gefährdet waren junge Tiere, die zum ersten Mal trächtig waren (Storz 1971).

#### d. Sporadische bovine Encephalomyelitis (SBE)

McNutt (1940) beschrieb als erster dieses Krankheitsbild beim Rind und konnte 1942 mit Stearns aus derartigen Fällen Chlamydien isolieren. Bei der SBE handelte es sich um eine disseminierte, nichteitrige Encephalitis und Meningitis, die als eine besondere Organmanifestation einer in vielen Fällen mild verlaufenden Allgemeininfektion anzusehen war. Bevorzugt trat sie bei Jungtieren bis zu drei Jahren auf und äußerte sich in Inaktivität, Fieber, Anorexie, Dyspnoe, Diarrhoe und gesteigerter Salivation. In schweren Fällen traten nervöse Symptome auf, die sich besonders als Bewegungsschwierigkeiten äußerten. Die klinischen Symptome konnten 10 - 15 Tage und in Einzelfällen bis zu einem Monat andauern (Storz 1971). Die Morbidität war niedrig, aber die Mortalität lag bei 50 - 60 %, nach Konrad u. Bohac (1959) sogar bei 100 %. Grundlegende Arbeiten über die SBE liegen von Menges u.M. (1953) und Wenner u.M. (1953) vor, die neun verschiedene Erregerstämme isolieren konnten, sowie von Bannister u.M. (1962), Csontos u. Szeky (1964) und Harshfield (1970).

#### e. Polyarthrititis

Eine Polyarthrititis, verursacht durch Chlamydien, wurde 1964 von Storz u.M. bei Kälbern beschrieben, die Gelenkschwellungen und einen steifen lahmen Gang zeigten. 1966 isolierten Storz u.M. Chlamydien aus der Synovialis solcher Gelenke, ebenso Littlejohn u.M. (1961) und Kölbl u. Psota (1968). Ein genaues Krankheitsbild der Polyarthrititis bei Kälbern beschrieben Storz u.M. (1966). Die Gelenke waren vergrößert, bei der Palpation waren Gelenke und Sehnen schmerzhaft und vermehrt warm. Die Tiere hatten Fieber, Diarrhoe, Fraßunlust

und lagen meist. Bei der Sektion zeigte sich, daß nicht nur die Gelenke der Gliedmaßen, sondern auch die Wirbelgelenke und die Mandibulargelenke sowie der gesamte Organismus betroffen waren.

Schon 1960 hatten Mendlowski u. Segre Polyarthritiden bei Schafen beschrieben, die vier Wochen nach einem längeren Transport aufgetreten waren. Sie erkannten Chlamydien als ihre Erreger; ebenso Storz u.M. (1963), die ausführlich die klinischen Erscheinungen und die pathologisch-anatomischen Veränderungen dieser Krankheit beschrieben.

Bemerkenswert ist die Tatsache, daß nur aus den westlichen und südwestlichen USA Berichte über Chlamydien-Polyarthritiden bei Schafen vorliegen.

Die Morbidität betrug zwischen 2 - 75 %, wobei leichte, junge Schafe weniger gefährdet waren. Die Tiere erkrankten allmählich, Rektaltemperaturen variierten von 39°C - 42°C, und es waren verschieden starke Lahmheitssymptome und Gliedmaßensteife festzustellen. Eine Versteifung des gesamten Körpers wurde ebenfalls beschrieben (Cutlip u.M. 1972). Es konnten Depressionen und verschiedentlich Konjunktivitis, in chronischen Fällen auch Abmagerung beobachtet werden. Die meisten Tiere waren nach 2 - 3 Wochen wieder gesund und behielten keine Schäden zurück.

Cutlip u.M. (1973) berichteten ausführlich über die Stufen der Veränderungen an den Gelenken nach einer intraartikulären Injektion von Chlamydien.

#### f. Konjunktivitis

Der erste Bericht über eine infektiöse Keratokonjunktivitis bei Schafen in England wurde von Dickinson u. Cooper (1959) gegeben. Aus der Tschechoslowakei berichtete Dymł (1965) von einer keratokonjunktivitis bei Rindern, die von Chlamydien verursacht worden war. Die Isolierung von Chlamydien war nur

im frühesten Stadium der Krankheit möglich. Storz u.F. (1967) stellten das Auftreten einer follikulären Konjunktivitis bei 90 % der Tiere einer Schafherde fest. Aus Konjunktivalsekret erkrankter Tiere konnten in 9 von 17 Fällen Chlamydien isoliert werden. Der Schweregrad der Erkrankung dieser Tiere reichte von geringer Hyperämie der Konjunktiven bis zur Chemosis, sowie Hyperämie der Lymphfollikel, begleitet von einer Keratitis und Pannusbildung. Die Läsionen traten gewöhnlich bilateral auf, aber oft in verschiedenen Schweregraden.

Von Interesse war die Feststellung, daß alle Tiere mit einer klinisch diagnostizierbaren Polyarthrititis auch an einer follikulären Konjunktivitis erkrankt waren und im umgekehrten Falle 10 - 25 % der Tiere einer untersuchten Herde auch eine Polyarthrititis hatten.

#### g. Mastitis

Blanco Loizelier (1969) berichtete bisher als einziger über natürlich vorkommende Mastitiden bei Rindern, die von Chlamydien verursacht wurden.

Experimentell gelang es Bannister u.M. (1959), Omori u.M. (1960), Schababerle (1965) und Corner u.M. (1967) eine Chlamydienmastitis bei Rindern hervorzurufen, die meist erheblich schwerer als andere ähnliche Mastitiden verlief.

Bei Schafen ist bisher von keiner natürlich vorkommenden Chlamydienmastitis berichtet worden. Dagegen konnten Papadopoulos u. Leontides (1972) Mutterschafe über den Zitzenkanal experimentell mit einem Schafabortstamm infizieren und eine akute Mastitis mit Störung des Allgemeinbefindens erzeugen, bei der die Milchproduktion bereits im Initialstadium fast völlig sistierte.

#### h. Genitale Chlamydieninfektionen

Hidiroglou u. Provost (1959) führten in Serienuntersuchungen festgestellte Sterilität bei Kühen auf eine Chlamydieninfektion zurück und konnten diese Behauptung auch serologisch und durch Elementarkörperchennachweis belegen.

Omori u.M. (1960) erzeugten experimentell durch Inokulation von Chlamydien in den Uterus von Kühen eine Endometritis.

Storz u.M. (1968) diagnostizierten bei Bullen in den Rocky Mountains chronische Entzündungen der akzessorischen Geschlechtsdrüsen und der Hoden und Nebenhoden und isolierten aus den Nebenhoden Chlamydien. Die Befruchtungsfähigkeit war weitgehend herabgesetzt. Nach Schoene (1971) ist eine Übertragung der Infektion auf Rinder durch den Deckbetrieb möglich. Er berichtete von einer Vaginitis-Endometritis bei durch infizierte Bullen gedeckten Rindern und wies bei ihnen mikroskopisch und serologisch Chlamydien als Erreger nach.

Eugster u.M. (1970) konnten nach parenteraler Chlamydien-Inokulation bei Bullen und Schafböcken aus deren Samen Chlamydien isolieren.

Es ist nicht bekannt, wie Bullen unter natürlichen Bedingungen zu der Genitalinfektion kommen, wahrscheinlich geht der Genitalinfektion eine Systemerkrankung voraus (Storz 1971).

#### 4. Antigenherstellungsverfahren

Voraussetzung für die Gewinnung eines hochtitrigen Antigens ist die optimale Konzentration von Chlamydien im Ausgangsmaterial, z.B. im Dottersack oder in der Allantoisflüssigkeit embryonierter Hühnereier oder in Gewebekulturen. Ferner ist die Freisetzung des entsprechenden Antigens erforderlich.

Die Verwendung einer unbehandelten Chlamydien suspension als Antigen ist möglich, bringt aber in der Regel unbefriedigende Ergebnisse.

Es wurden verschiedene Methoden beschrieben, um einen Aufschluß der Chlamydien zu erreichen.

##### A. Gruppenspezifisches Antigen

###### a. Kochantigen

Die einfachste Methode ist die Kochantigenherstellung, die von Stamp u.M. (1952), Beer (1958) u.a. angegeben wurde. Durch 20-30minütiges Kochen einer Chlamydien suspension im Wasserbad gelang die Freisetzung des gruppenspezifischen, hitzestabilen Antigens, das für serologische Tests geeignet war.

###### b. Behandlungsverfahren mit Trypsin, Phenol, Äther, Azeton und Alkohol

Zur Erhöhung des Reinheitsgrades und Verminderung der Eigenhemmung in der KBR wurden die Behandlung mit Trypsin (Roots u. Rott 1957), das wiederholte Einfrieren und Auftauen (Roots u. Rott 1958), die Phenolbehandlung (Grimes u.M. 1970), die Zertrümmerung der Elementarkörperchen durch Glasperlen und die wiederholte Zentrifugation (Roots u. Schmitt diel 1961), sowie die Extraktion mit Äther (Hillemann u. Nigg 1946) erprobt. Volkert u. Møller Christensen (1955), Møller

Christensen u. Volkert (1955), sowie Möller Christensen (1957) ließen der Ätherextraktion eine Alkoholbehandlung oder einen Kochprozeß vorausgehen und eine Fällung mit Azeton folgen. Beer (1965) erzielte die besten Ergebnisse, als er die Ausgangssuspension vor der Ätherextraktion einem 20-minütigen Kochprozeß und der Behandlung mit 96 %igem Alkohol unterzog. Mittels Äther ließ sich das gruppenspezifische Antigen extrahieren und dann mit Azeton ausfällen. Eine Weiterentwicklung dieser Technik beschrieben Dhir u.M. (1971).

c. Antigenherstellung durch Natriumlaurylsulfat- (NLS-) Behandlung

1956 benutzten Benedict u. O'Brien das oberflächenaktive Natriumlaurylsulfat zur Antigenextraktion. Als Ausgangsmaterial verwendeten sie infizierte Allantoisflüssigkeit embryonierter Hühnereier. Zur Bestimmung der NLS-Menge, die zur Extraktion benötigt wurde, mußte erst der Stickstoffgehalt der C.-Suspension ermittelt werden, um das optimale Verhältnis - mg NLS / mg Stickstoff der C.-Suspension - anwenden zu können. Am erfolgreichsten extrahierten sie mit 1 % NLS bei pH 8,0 (Verhältnis mg NLS/mg N der C.-Suspension von 1:30) und bei Raumtemperatur über 24 h. Danach zentrifugierten sie die Suspension für 30 min. bei 35 000 U/min. und versetzten den Überstand mit 5 % Bariumchlorid, bis keine Ausfällung mehr beobachtet werden konnte. Zum Abschluß wurde nochmals zentrifugiert und dann dialysiert.

d. Antigenherstellung durch Natriumdesoxycholatbehandlung

Von Jenkin (1960) wurde zur Präparation von Chlamydienzellwänden ein Verfahren mit Natriumdesoxycholat (DO) entwickelt, das technisch relativ einfach auszuführen ist und bei der Antigenherstellung weit verbreitet Anwendung fand (Jenkin u.M. 1961, Barron u.M. 1967, Riera u.M. 1970, Collins u. Barron 1970, Barron u.M. 1972, Lewis u.M. 1972). Alle Autoren bezogen sich auf Jenkin (1960), der die C.-Suspension mit 1 % Natrium-

desoxycholat in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,4 versetzte und für 4 h bei 45°C schüttelte. Als Modifikation wurde durch Vorbehandlung mit Trypsin oder durch Beschallen ein Aufschliessen der Zellen versucht. Besonders das Beschallen erbrachte gute Resultate. Gyulai u.M. (1969) griffen diese Methode auf und erhielten durch zweistündige Bearbeitung einer DO-behandelten C.-Suspension mit Ultraschall in mehreren Abschnitten ein stabiles, hochtitriges gruppenspezifisches Antigen.

### B. Stammspezifisches Antigen

Fraser u. Berman (1965) beschrieben ausführlich die Herstellung von stammspezifischen Antigenen aus Zellwandbruchstücken nach Behandlung von gereinigten, intakten Elementarkörperchen mit Natriumdesoxycholat und Trypsin. Sie bezogen sich dabei auf die Arbeiten von Jenkin (1960) und Jenkin u.M. (1961). Im Gegensatz zum hitzelabilen, stammspezifischen Antigen nicht vorbehandelter Partikel gewannen sie aus Zellwandfragmenten ein hitzestabiles, stammspezifisches Antigen.

Vedros (1967) beschrieb die Herstellung eines hitzelabilen, stammspezifischen Antigens durch Beschallen einer gereinigten EK-Suspension, die mit Glasperlen versetzt wurde.

Collins u. Barron (1970) gewannen stammspezifische Antigene, indem sie mit Desoxycholat vorbehandelte Partikel für eine längere Zeit beschallten.

## 5. Serologische Nachweismethoden

Zur Feststellung einer Chlamydien-Erkrankung kann man die klinischen Erscheinungsformen und die pathologisch-anatomischen Veränderungen heranziehen, zur sicheren Diagnose ist jedoch der Erregernachweis nötig. Er kann durch den mikroskopischen Nachweis der EK, z.B. in der Nachgeburt oder in Synovialflüssigkeit, kulturell, oder im Tierversuch geführt werden. Der direkte Erregernachweis gelingt meist nur in den ersten Krankheitstagen. Danach kommt nur noch der indirekte, serologische Nachweis in Betracht, hauptsächlich die Komplementbindungsreaktion.

Dem Antikörpernachweis ist bei Chlamydiosen eine Beweiskraft zuzusprechen, wenn ein sehr hoher Titerwert festgestellt werden kann oder bei wiederholter Untersuchung eine deutliche Titerbewegung zu beobachten ist.

Woernle u.M. (1973) sehen die Möglichkeit der Beurteilung eines ablaufenden Krankheitsgeschehens in Beständen gegeben, wenn Seren von mehreren Tieren eines Bestandes zur Untersuchung kommen. Durch Aufstellung und Auswertung eines Immunogrammes, bei dem bekannte Kennwerte berücksichtigt werden, kann nach Woernle wertvolle Auskunft über die Ausbreitung einer Infektion im Bestand gegeben werden.

### a. Die Komplementbindungsreaktion (KBR)

Bei epidemiologischen Untersuchungen von Chlamydien-Infektionen bei Tieren ist die KBR, die 1935 von Bedson zum ersten Mal bei Untersuchungen über Chlamydien angewandt wurde, die bisher einzige serologische Methode mit praktischem Nutzen.

Bei diagnostischen Reihenuntersuchungen wird ein gruppenspezifisches Antigen benutzt, während zur Differenzierung verschiedener Chlamydien-Stämme typspezifische Antigene verwendet werden.

Ergebnisse in der KBR sind bei den bekannten Chlamydien-Krankheiten erst 7 - 10 Tage, oft auch später, nach der Infektion zu erwarten, da sich dann erst Antikörper im Blut befinden. Sie erreichen ihren höchsten Titer durchschnittlich um den 30. Tag p.i. und sind dann noch über mehrere Monate hinweg nachweisbar (Mitscherlich 1955, Storz 1971).

Bedeutend erscheint die Feststellung von Murray (1964), Storz u.M. (1968) und Jawetz u.M. (1965), daß es bei intestinalen Erkrankungen möglich ist, daß im Serum zirkulierende Antikörper nicht nachzuweisen sind oder wie beim Trachom des Menschen nur eine sehr schwache Antikörperbildung angeregt wird.

White u.M. (1970) fordern bei Verdacht auf eine Chlamydiose beim Rind die Überprüfung des Serums über einen Zeitraum von drei Monaten, da nach ihren Untersuchungen die Antikörperentwicklung erst in der zweiten bis dritten Woche einsetzt und ein Titeranstieg nur sehr langsam zu verzeichnen ist.

In der technischen Durchführung der KBR hat sich neben der Makromethode die von Fraser (1969) beschriebene Mikromethode auch bei der Feststellung von Chlamydien-Antikörpern durchgesetzt.

Bei der Verwendung eines desoxycholatbehandelten Antigens in der KBR muß dieses dialysiert werden. Collins u.M. (1970) schlugen die Dialyse des Natriumdesoxycholatextraktes gegen Triethanolamin-Puffer 0,15 M bei einem pH-Wert von 7,2 - 7,3 vor, jedoch ist auch die Verwendung von physiologischer Kochsalzlösung möglich.

#### b. Der Präzipitationstest

Der Präzipitationstest ist eine wirksame Methode zur Identifizierung und Analyse von Mikroorganismen. Neben dem geringen Material- und Arbeitsaufwand ist die einfache technische Durchführung von großem Vorteil. Der Test bietet sich daher für Massenuntersuchungen an, erfüllt aber auch die Forderung

nach hoher Spezifität, wenn die nötigen Kontrollen eingehalten werden.

Die präzipitierenden Antikörper sind in der Regel kürzer nachweisbar als die komplementbindenden oder hämagglutinationshemmenden. Ihr Nachweis erlaubt daher zusätzliche Rückschlüsse über eine erst kürzlich stattgefundene Infektion (Wachendörfer 1964).

Es liegen aber auch Nachteile qualitativer und quantitativer Art vor. So stören gelegentlich bei der Beurteilung der Reaktion unspezifische Präzipitationslinien, die meist auf Proteine zurückzuführen sind. Palmer u.M. (1971) berichteten über unspezifische Präzipitationslinien, die im Test nach der Antigenherstellung mit Natriumlaurylsulfat aufgetreten waren und die Auswertung erschwerten, indem sie die spezifischen Linien überdeckten oder sogar eine Antigen-Antikörper-Reaktion blockierten.

Als qualitative Nachteile können auch Hofbildung und unspezifische Ausfällungen bei Verwendung lipidreicher Seren und Gewebe hinzukommen.

In quantitativer Hinsicht ist der Präzipitationstest oft anderen serologischen Tests unterlegen, weil größere Mengen an Reaktionskomponenten erforderlich sind, um eine sichtbare Präzipitation hervorzurufen.

Die Verwendung dieses Tests bei Chlamydieninfektionen brachte bisher nur mäßigen Erfolg, da die Herstellung eines gereinigten, konzentrierten, löslichen Antigens Schwierigkeiten bereitete.

1964 benutzten Parikh u. Shechmeister einen mit Fluorcarbon behandelten Meningopneumonitis-Stamm, der im Dottersack bebrüteter Hühnereier gezüchtet wurde und erzielten mit Kaninchenhyperimmunseren sechs spezifische Präzipitationslinien.

Barron u. Collins (1967) verwendeten die Präzipitation zur Charakterisierung der Antigene von *C. trachomatis* und zur Darstellung ihrer Beziehung zu jenen anderer Chlamydien.

Zur Antigenherstellung benutzten sie drei Methoden :

1. Extraktion mit Natriumdesoxycholat
2. Beschallung
3. Beschallung nach Natriumdesoxycholatrextraktion.

Im desoxycholatbehandelten Extrakt konnten sie gruppenspezifische Antigene mittels der Präzipitation nachweisen und die Zugehörigkeit verschiedener Stämme zu einer Gruppe beweisen. Ebenso demonstrierten sie Eigenschaften wie Hitzestabilität und Periodatempfindlichkeit des Antigens mit diesem Test. Durch längeres Beschallen von Desoxycholatrextrakten erreichten sie zusätzlich die Freisetzung des typspezifischen Antigens. Die typspezifischen Antigenlinien bildeten sich - unabhängig von der Konzentration - nahe dem Antigenreservoir, die gruppenspezifischen lagen näher beim Serumloch.

1970 verglichen die gleichen Autoren die gruppen- und typspezifischen Antigene mehrerer C.trachomatis-Stämme und C.psittaci-Stämme. Die gruppenspezifischen Antigene der drei C.trachomatis-Stämme bildeten eine spezifische Linie mit homologem Antiserum und mit Antiserum gegen andere C.trachomatis-Stämme. Die Verschiedenheit der typspezifischen Antigene demonstrieren sie mit drei C.psittaci-Stämmen.

Barron u. Collins (1967), Collins u. Barron (1970), Riera u. Barron (1970) und Barron u.M. (1972) untersuchten Kälber, Schafe und Pferde, die experimentell mit verschiedenen C.psittaci-Stämmen infiziert worden waren vergleichend im Präzipitationstest und in der KBR und wiesen auf die Verwendbarkeit des Präzipitationstestes bei der Untersuchung natürlich infizierter Tiere hin. Präzipitation trat bei Seren mit KBR-Titern von 1:8 bis 1:256, meist erst bei 1:32 und mehr auf, jedoch konnte eine Relation zwischen Stärke der Präzipitation und Titerhöhe nicht festgestellt werden.

Eine ausführliche Arbeit über die Verwendbarkeit des Agargelpräzipitationstestes für die Untersuchung von Chlamydien-Antigenstrukturen liegt von Kuo u.M. (1971) vor. Sie arbeiteten

mit den drei C.trachomatis-Stämmen G-17 (Typ A), TW-5 (Typ B) und "Mäusepneumonitis". Zur Herstellung der Testantigene wurden die Chlamydien in Gewebekulturen (HeLa 229) gezüchtet, für die Hyperimmunisierung der Kaninchen aber Chlamydien benutzt, die im embryonierten Hühnerei vermehrt wurden.

Zwei Voraussetzungen waren für das Gelingen der Präzipitation von Bedeutung. Einmal die Konzentration der Antigene, zum anderen die Freisetzung des löslichen Antigens, die durch langes Beschallen (1 1/2 bis 2 h mit einem Bronwill Biosonik III bei kleinster Intensität) oder durch Natriumdesoxycholatbehandlung am besten erreicht wurde. Andere Methoden, wie z.B. wiederholtes Einfrieren und Auftauen, Behandlung mit heißem oder kaltem Phenol oder enzymatische Behandlung mit Lysozymen wurden erprobt, aber sie brachten schlechtere Ergebnisse.

Im Test wurden bis zu sieben verschiedene Antigenkomponente festgestellt. Am häufigsten traten drei Präzipitationen auf, die als hitzestabile Gruppenantigene erkannt wurden. Alle drei besaßen einen Kohlenhydratanteil, ein desoxycholat-lösliches Antigen wurde als ein Lipid-Kohlenhydrat-Komplex beschrieben.

Die Darstellung des hitzelabilen, typspezifischen Antigens im Präzipitationstest (Barron u. Collins 1967, Collins u. Barron 1970) gelang Kuo u.M. (1971) nicht.

Hinsichtlich der Technik des Testes richteten sich die meisten Autoren nach Conant u.M. (1966). Sie versuchten aber durch verschiedene Modifikationen eine Verbesserung zu erreichen. So inkubierten Barron u.M. (1972) die Seren bei 56°C für 30 min., um unspezifische Präzipitationslinien zu verhindern.

Traaavik u.M. (1972) fanden bei Verwendung eines geschlossenen hexagonalen Systems, in dem die Diffusion des Serums oder des Antigens von den peripheren Löchern her nach rückwärts verhindert wurde, eine 2 bis 4-fache Empfindlichkeitssteigerung des Testes.

c. Andere serologische Nachweismethoden

Neben der KBR und dem Präzipitationstest, die beide für routinemäßige, diagnostische Untersuchungen geeignet sind, kann man auch mit folgenden Testmethoden eine Chlamydieninfektion feststellen :

- c1. Der Agglutinationstest, von Mendlowski u. Segre (1963) zum ersten Mal zur Chlamydiendiagnose bei Schafen verwendet, zeigt eine hohe Empfindlichkeit (Grimes u.M. 1966) und gegenüber der KBR den Vorteil, daß gruppenspezifische Antikörper schon im frühen Stadium der Infektion nachgewiesen werden können (Page u. Bankowski 1960). Die Herstellung des dazu nötigen Antigens ist jedoch aufwendig und kostspielig.
- c2. Der Neutralisationstest ist in hohem Grade stamm- und typspezifisch. Er kann ausgeführt werden als Röhrchen-neutralisationstest, Plaque-Reduktionstest und Mikroplattentest. Die Verwendung von Zellkulturen ermöglicht eine quantitativ genaue Prüfung der Infektiosität, indem die infizierten Zellen nach Färbung mit Giemsa oder mittels fluoreszierender Antikörper durch Zählung bestimmt werden.
- c3. Der Haemagglutinationshemmungstest (HAH)  
Der Nachteil des Testes liegt darin, daß das haemagglutinierende Antigen instabil ist und sich auch eingefroren rasch verschlechtert (Haig u. Hillemann 1950, Henneberg u.M. 1966). Es werden haemagglutinationshemmende Antikörper bestimmt, deren Bildung durch das Haemagglutinin der Chlamydien angeregt wurde. Henneberg u. Jordanski (1965) berichteten ausführlich über die technische Durchführung des HAH.
- c4. Der indirekte Haemagglutinationstest (IHA) schien nach Untersuchungen von Benedict u. O'Brien (1958) für die Chlamydiendiagnose von begrenztem Wert. Aufgrund neuerer Arbeiten erkannte man aber die Verwendbarkeit des IHA

nicht nur für die Diagnostik, sondern auch für die Differenzierung und Charakterisierung von Stämmen. So differenzierte Vedros (1967) mit dem IHA den *C.psittaci*-Stamm 6 BC von vier *C.trachomatis*-Stämmen. Dhir u.M. (1971) bewiesen mit dem IHA, daß Polysaccharide für die Gruppenreaktion der Chlamydien verantwortlich sind. Lewis u.M. (1972) verglichen die Titer von Seren, die sie in der KBR und in dem IHA getestet hatten und fanden allgemein höhere IHA-Titer. Eine Austestung im Mikrotitersystem verminderte die Empfindlichkeit gegenüber der Makromethode, aber der Mikrotest war immer noch empfindlicher als die KBR.

- c5. Der Immunofluoreszenz-Test ermöglicht die immunologische Identifizierung von Organismen als Chlamydien gleichzeitig mit ihrer Lokalisation. Er wurde beschrieben für verschiedene Anwendungsbereiche von Nichols u.M. (1963), Dawson u.M. (1971), Ross u. Borman (1963), Eugster u.M. (1970), Lewis u.M. (1972), die den Test als "genus"-spezifisch bezeichneten. Eine Typspezifität ist auch nach Wang u. Grayston (1970) gegeben. Sie konnten mit Hilfe eines indirekten Immunofluoreszenz-Testes acht verschiedene *C.trachomatis*-Stämme differenzieren. Blanco Loizelier (1971) untersuchte Chlamydieninfektionen beim Pferd, Rind, Schaf und Kaninchen mit dem direkten Immunofluoreszenz-Test. Er hielt den Test bei akuten Fällen für brauchbar, wies aber darauf hin, daß das zu untersuchende Material frisch sein muß.

### III. Eigene Untersuchungen

#### 1. Material und Methode

##### A. Erregerstamm

Zur Antigengewinnung stand der an die Allantoishöhle des bebrüteten Hühnereies adaptierte Schafabortstamm 8583 in der 122. Passage zur Verfügung<sup>+</sup>. Der Stamm war nach der 89. Dottersackpassage in die Chorioallantoishöhle des bebrüteten Hühnereies übertragen und in weiteren 33 Passagen adaptiert worden (Wachendörfer u. Peheim 1962).

##### B. Untersuchungsmaterial

Zur Untersuchung kamen folgende Seren :

- a. 1066 Rinderseren, gewonnen aus dem Blut von Schlachttieren vom Schlacht- u. Viehhof Frankfurt/M.<sup>++</sup>
- b. 70 Schafseren, freundlicherweise überlassen vom Staatl. Vet. Untersuchungsamt Frankfurt/M.<sup>+</sup>
- c. 32 Schafseren, vom Institut für Hygiene u. Infektionskrankheiten d. Tiere, Gießen, zur Verfügung gestellt
- d. 50 Schafseren, gewonnen von einer Versuchsherde des Lehrgutes der Universität Gießen (Oberer Hardthof)<sup>+++</sup>

<sup>+</sup> Für die Überlassung des Chlamydienstammes und von Schafseren danke ich Herrn Prof. Wachendörfer, Staatl. Vet. Untersuchungsamt Frankfurt/M.

<sup>++</sup> Für die Möglichkeit der Blutentnahme bei den Schlachtrindern danke ich Herrn Dr. Spengler, Schlachthof Ffm.

<sup>+++</sup> Für die Möglichkeit der Blutentnahme in der Versuchsherde danke ich Herrn Prof. Finger

ad a. Rinderseren

Die Rinderseren wurden im Frühjahr 1972 gesammelt. Sie stammten von Schlachttieren aus Hessen und dem süddeutschen Raum. Das durchschnittliche Alter der Tiere lag zwischen 2 - 4 Jahren. Kenntnisse über eventuell überstandene Krankheiten waren nicht erhältlich. Da in Erfahrung gebracht werden konnte, aus welchen Herkunftsgebieten die Schlachttiere stammten, konnten die Ergebnisse der serologischen Untersuchung getrennt betrachtet und ausgewertet werden.

Carotisblut wurde in nummerierten Plastikröhrchen gesammelt und durch zweimaliges Zentrifugieren bei 2500 U/min. für 10 min. daraus Serum gewonnen.

Nach der Zugabe von Merthiolat 1:10 000 wurden die Seren bis kurz vor ihrer Verwendung in der KBR und im Präzipitationstest bei  $-20^{\circ}\text{C}$  in der Tiefkühltruhe aufbewahrt und vor Gebrauch bei Zimmertemperatur aufgetaut.

ad b. Schafseren

Die Schafseren, die mir das Staatl. Veterinäruntersuchungsamt Frankfurt/M. zur Verfügung stellte, stammten von Schafen aus einer extensiv gehaltenen Schafherde aus Gambach/Wetterau. In dieser 1000 Tiere umfassenden Herde waren in den letzten Jahren immer wieder gehäuft Aborte aufgetreten.

ad c. Schafseren

Die Schafseren aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Gießen, waren Seren, die aus diagnostischen Gründen zur Einsendung gekommen waren. 6 der 32 Seren stammten von Schafen, bei denen Chlamydienabort festgestellt worden war. Sie werden im folgenden als "positive Kontrollseren" bezeichnet, da sie sowohl in der KBR hohe Titer auswiesen als auch in der Agargelpräzipitation reagierten.

ad d. Schafseren

Diese Seren wurden von Schafen einer Herde gewonnen, in der in letzter Zeit vereinzelt Tiere verworfen hatten.

6. Vermehrung des Chlamydienstammes

Zur Gewinnung des Ausgangsmaterials für die Antigenherstellung erfolgte die Züchtung des Stammes in der Chorioallantoishöhle 11 Tage vorbebrüteter Hühnerembryonen. Inokuliert wurden unter sterilen Bedingungen je 0,2 ml chlamydienreiche Allantoisflüssigkeit, deren Gehalt an EK mikroskopisch überprüft worden war. Sie mußte in der Regel 1:5 verdünnt werden, um einen durchschnittlichen Absterbetermin der Embryonen zwischen dem 5. und 6. Tag p.i. zu erreichen. In dieser Zeit war der höchste EK-Gehalt zu erwarten. Dem Inokulum wurden 500γ Streptomycin pro ml zugesetzt.

Durch tägliche Durchleuchtung wurden die Eier mit den abgestorbenen Embryonen aussortiert. Das Absterben der Embryonen in den ersten drei Tagen p.i. wurde als unspezifisch, bzw. der EK-Gehalt nach mehrmaliger Kontrolle als zu gering betrachtet und die Eier verworfen. Starben die Embryonen nicht, so erschien die Verwertung nach Abtötung kurz vor Bebrütungs-ende wenig sinnvoll, da die Allantoisflüssigkeit dann quantitativ und qualitativ schlechte Ergebnisse brachte.

Im einzelnen erfolgte die Inokulation und Gewinnung der Allantoisflüssigkeit nach den von Yalpa (1959), Wachendörfer u. Peheim (1962) beschriebenen Kriterien.

Zur bakteriologischen Prüfung wurden Ausstriche auf Blutagarplatten angefertigt und nach 24-stündiger Bebrütung bei 37°C kontrolliert.

## D. Methodik des Erregernachweises

### a. Direkter mikroskopischer Nachweis

Zur Kontrolle des EK-Gehaltes wurde von der Allantoisflüssigkeit jedes einzelnen Eies ein Präparat angefertigt und nach der Methode von Stamp u.M. (1950) gefärbt.

In der mikroskopischen Überprüfung wurde eine Auswertung in den Stufen von + bis +++ vorgenommen und die Allantoisflüssigkeit der +++ und +++-Präparate gesammelt.

### b. Indirekter Nachweis einer Chlamydieninfektion durch serologische Tests

Nach ausreichender Vermehrung der Chlamydien und Sammlung der Ausgangssuspension wurden verschiedene Antigenherstellungsverfahren angewandt, um ein qualitativ und quantitativ gutes Antigen zu bekommen. Dieses wurde dann in der KBR und für den Agargelpräzipitationstest verwendet.

## E. Antigenherstellung

### a. Kochantigenherstellung

Bei der Kochantigenherstellung wurden je Präparation 50 ml unverdünntes Ausgangsmaterial für 20 min. im Wasserbad gekocht. Die Aufschwemmung wurde dann entweder mit 2000 U/min. für 10 min. zentrifugiert, der Bodensatz verworfen und der Überstand als Antigen benutzt, oder ohne Zentrifugation aufgehoben und nach Absetzenlassen der Überstand als Antigen verwendet. Zur Konservierung wurde Merthiolat 1:10 000 zugesetzt.

Das Antigen war eine milchige, grauweiße, mit Flocken durchsetzte Suspension, die Bodensatz bildete.

#### b. Behandlung durch Ultraschall

Das Ausgangsmaterial wurde vor oder nach dem Kochprozeß für 1-2 min. mit einem Branson-Sonifier Modell "Power Sonic", 20 KC, auf Stellung 3 im Eisbad beschallt.

#### c. Methodik der Frigen-Behandlung

In Anlehnung an die Antigenherstellung mit Frigen bei Coxiellen (Schliesser 1972), wurde diese Methode wie folgt auch bei Chlamydien erprobt :

1. 40 ml infizierter ALF wurden 2 ml Frigen zugesetzt und mit dem Ultraturax dreimal 1 min. homogenisiert.
2. Zentrifugation, 1500 U/min, für 10 min.
3. Wiederholung der Frigenbehandlung des Überstandes
4. Die gewonnenen Überstände wurden bei 12 000 U/min. 2 h zentrifugiert, alle gewonnenen Sedimente mit Phosphatpuffer aufgeschwemmt, homogenisiert, bei 2000 U/min. für 10 min. zentrifugiert und der Überstand als Antigen verwendet oder nach der Natrium-laurylsulfat-Methode weiterbehandelt.

#### d. Methodik der Natriumlaurylsulfat-(NLS-)Behandlung

Die zur Berechnung der Natriumlaurylsulfatmenge nötige Stickstoffgehaltsbestimmung der Ausgangssuspension (Benedict u. O'Brien 1956) wurde über die Proteinbestimmung nach Folin durchgeführt und durch Multiplikation des Ergebnisses mit 0,16 der N-Gehalt errechnet. Außer dem von Benedict u. O'Brien (1956) angegebenen optimalen Verhältnis mg NLS/mg N von 1:30, wurden auch die Mischungsverhältnisse 1:10, 1:20, 1:40, 1:50, 1:60 und 1:80 erprobt. Die durch 1 - 2-minütiges Beschallen oder durch Frigenbehandlung vorbereitete Ausgangssuspension wurde mit 1 % NLS, pH 8 in den verschiedenen Mischungsverhältnissen versetzt und dann bei Zimmertemperatur für 24 h

geschüttelt. Dann wurde sie bei 14 000 U/min. für 1 h zentrifugiert und dem Überstand 5 % Bariumchlorid langsam zugegeben, bis die auftretende Ausfällung beendet war. Anschließend wurde der Extrakt bei 8000 U/min. für 20 min. geklärt.

#### e. Methodik der Natriumdesoxycholatbehandlung

Als Ausgangsmaterial wurden jeweils 50 ml chlamydienhaltige ALF verwendet und die Partikel bei 12 000 U/min. (Phywe-Zentrifuge Pirouette) 1 h lang zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Satz nach Auswiegen mit 1 %igem Natriumdesoxycholat in 0,01 M Phosphatpuffer, pH 7,2, im Verhältnis 1:6 (1 Teil Sediment, 6 Teile DO) versetzt. Nach Resuspension und zweimaligem Beschallen von je 30 sec. bis 1 min. mit dem Branson-Sonifier Modell "Power Sonic", 20 KC, Stufe 3, wurde die Suspension 4 h bei 45°C geschüttelt und danach 1 h bei 12 000 U/min. zentrifugiert. Der Überstand wurde direkt als Antigen im Präzipitationstest verwendet; für den Gebrauch in der KBR wurde das Antigen 24 h gegen physiologische Kochsalzlösung bei +4°C dialysiert.

#### Modifikationen der Natriumdesoxycholatbehandlung

Es wurde versucht, durch folgende Modifikationen der DO-Behandlung ein qualitativ besseres Antigen zu gewinnen :

##### 1. Trypsinvorbehandlung

Die in der Literatur (Jenkin 1960) angegebene Vorbehandlung mit Trypsin wurde in zwei Konzentrationen - 0,5 % und 1 % Trypsin - erprobt und mit den Ergebnissen ohne Trypsinbehandlung verglichen.

##### 2. Vorbehandlung mit Ultraschall

Vergleichend wurden die Ausgangssuspensionen einmal ohne Vorbehandlung mit 1 %igem Natriumdesoxycholat versetzt, zum anderen vorher 2 min. mit dem Branson-Sonifier Modell "Power Sonic", 20 KC, Stufe 3 im Eisbad beschallt.

### 3. DO-Menge

Durch die Zugabe unterschiedlicher Mengen von 1 %igem Natriumdesoxycholat wurden die Mischungsverhältnisse 1:2, 1:4, 1:6 und 1:8 erprobt. Konstant blieb hierbei der pH-Wert von 7,2, die Temperatur von +45°C und das 4-stündige Schütteln.

### 4. Prozentgehalt von DO

Durch Verwendung von 0,5 %igem, 1 %igem und 2 %igem Natriumdesoxycholat sollte die Auswirkung des Prozentgehaltes von DO auf die Antigenherstellung erprobt werden.

### 5. pH-Wert

Unter Einhaltung des DO-Mischungsverhältnisses von 1:6, der Temperatur von +45°C und dem 4-stündigen Schütteln wurde die Behandlung bei den pH-Werten 6,0 , 7,2 , 8,0 und 9,0 durchgeführt.

### 6. Temperatur

Außer +45°C wurden bei einem DO-Mischungsverhältnis von 1:6, dem pH-Wert 7,2 und dem 4-stündigen Schütteln noch der Einfluß einer Temperatur von +20°C und +36°C überprüft.

### 7. Mechanische Bewegung

Zur Prüfung der Auswirkung der mechanischen Bewegung während der Einwirkung von DO wurden Proben 2 h , 4 h , 8 h mit einer Frequenz von 2/sec. geschüttelt und die Ergebnisse mit der Behandlung ohne Schütteln verglichen.

### 8. Zentrifugation

Vor der abschließenden Zentrifugation bei 12 000 U/min. für 1 h wurde ein Teil der Suspension abpipettiert und mit dem Überstand nach der Zentrifugation verglichen.

### 9. Einengung des Antigens

Um einen höheren Antigentiter zu erreichen, wurde das Antigen gegen Polyäthylenglykol 20 000 dialysiert und verschie-

den stark bis auf maximal 1/10 des Ausgangsvolumens eingeengt.

10. Wiederholte Desoxycholatbehandlung

Das Sediment, das bei der DO-Behandlung nach der abschließenden Zentrifugation entstand, wurde in einem zweiten, gleichen Arbeitsgang nochmals aufgearbeitet.

F. Methodik der Durchführung der KBR

Die Untersuchungen wurden mit der Mikromethode durchgeführt.

a. Antigen

Verwendet wurden 4 Einheiten des durch Natriumdesoxycholatbehandlung hergestellten Antigens.

Zum Vergleich wurden am Anfang der Testreihe Seren auch mit dem Ornithose-Antigen der Behring-Werke, Marburg, nach der vorgeschriebenen Methode überprüft.

b. Seren

Alle vorhandenen Seren wurden in der KBR nach Inaktivierung (30 min. bei  $+56^{\circ}\text{C}$ ) in Verdünnungsstufen von 1:2 titriert und getestet.

c. Komplement

Das Komplement wurde im Institut aus Meerschweinchenblut hergestellt, mit dem Stabilisator nach Richardson im Verhältnis 1:8 versetzt und bei Kühlschranktemperatur ( $+4^{\circ}\text{C}$ ) in dunklen Glasfläschchen aufbewahrt.

Richardson-Stabilisator :

|          |                                                               |         |
|----------|---------------------------------------------------------------|---------|
| Lösung A | $\text{H}_3\text{BO}_3$                                       | 0,93 g  |
|          | $\text{Na}_2\text{B}_4\text{H}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ | 2,29 g  |
|          | $\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_6$                              | 11,34 g |
|          | ad 100 ml (mit phys. NaCl-Lösung)                             |         |

|                                   |                                                               |        |
|-----------------------------------|---------------------------------------------------------------|--------|
| Lösung B                          | $\text{Na}_2\text{B}_4\text{H}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ | 0,57 g |
|                                   | $\text{NaN}_3$                                                | 0,81 g |
| ad 100 ml (mit phys. NaCl-Lösung) |                                                               |        |

Gebrauchslösung : gleiche Teile A und B

Vor Gebrauch wurde das Komplement ausgewertet und für den Test auf exakt 2 Einheiten eingestellt.

d. Erythrozyten, hämolytisches System

Die verwendeten Schaferythrozyten wurden im Institut aus Hammelblut gewonnen. Letzteres wurde bei der Gewinnung mit Alsever-Lösung versetzt und dreimal mit phosphatgepufferter NaCl-Lösung (PBS) gewaschen. Mit PBS wurde dann eine 2 %ige Erythrozytensuspension hergestellt. Vor den Versuchen wurde in gleichen Volumina die 2 %ige Erythrozytensuspension und die Arbeitsverdünnung des Ambozeptors der Behring-Werke, Marburg, (4 hämolytische Einheiten) zum hämolytischen System zusammengegeben. Das hämolytische System wurde vor den Versuchen 30 min. bei  $+37^\circ\text{C}$  inkubiert.

e. Vorversuche

In den Vorversuchen wurden Ambozeptor- und Komplementauswertung nach den allgemein gültigen Kriterien vorgenommen.

f. Hauptversuch

Die Reaktion wurde mit Wärmebindung durchgeführt, wobei die Platten mit den Reagentien 1 h bei  $+37^\circ\text{C}$  inkubiert wurden, bevor das hämolytische System zugegeben wurde. Der Test wurde eine weitere Stunde bei  $+37^\circ\text{C}$  inkubiert und das Ergebnis dann abgelesen.

g. Kontrollen

1. Serumkontrolle : gleiche Serumverdünnungen wie im Test
2. Komplementkontrolle : Zur Kontrolle der 2 Einheiten Komplement wurde die Gebrauchsverdünnung (z.B. 1:40) und die beiden höheren Verdünnungen (z.B. 1:80 und 1:160) angesetzt.

3. Antigenkontrolle

4. Erythrozytenkontrolle

5. Positives Kontrollserum : Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit des Testes wurde ein Kontrollserum mit bekanntem KBR-Titer mitgetestet.

## G. Methodik des Agargelpräzipitationstestes

### a. Herstellung der Agarplatten

Auf 5 x 5 cm großen Glasplättchen wurden 7 ml 0,8 %ige Agrose in 0,15 M NaCl-Lösung aufpipettiert, die im Dampftopf verflüssigt worden war. Nach dem Erstarren wurden Löcher mit einer vorgefertigten Schablone nach dem hexagonalen System ausgestanzt. Die Löcher hatten einen Durchmesser von 3 mm und einen Abstand von 1,5 mm.

Für fotografische Zwecke wurde der Test in Petrischalen (Durchmesser 55 mm) angesetzt. Die Löcher hatten in diesem Falle einen Durchmesser von 4 mm, die Abstände betrugen 4 mm.

Die Agarplatten wurden bis zur Verwendung in Petrischalen im Kühlschrank aufbewahrt.

### b. Antigen

Verwendet wurde ein durch DO-Behandlung hergestelltes, nicht dialysiertes Antigen mit einem KBR-Titer von 1:128.

### c. Seren

Die Seren wurden für den Test in der Regel nicht inaktiviert.

### d. Kontrollen

Als Kontrollen wurden folgende Reagentien in den Test miteinbezogen :

1. ein bekanntes negatives Serum
2. ein bekanntes positives Serum
3. 1 %ige Natriumdesoxycholat-Lösung
4. "negatives Antigen"

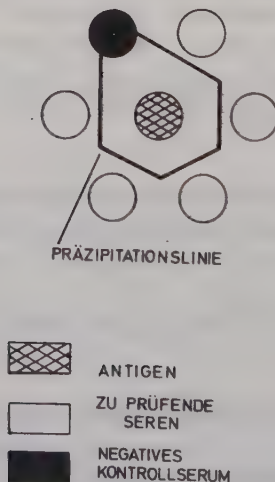
Das "negative Antigen" wurde aus nichtinfizierter ALF hergestellt, die der gleichen Behandlung unterzogen wurde wie bei der Antigenherstellung aus infizierter ALF.

e. Durchführung

Bei Übersichtsauswertungen wurde das zentrale Loch mit Antigen gefüllt und die peripheren Löcher mit den Testseren. Die Testreagentien wurden zweimal im Abstand von einer Stunde nachgefüllt.

Abb. 1 :

Schematische Darstellung des Systems und des Nachweises von Antikörpern



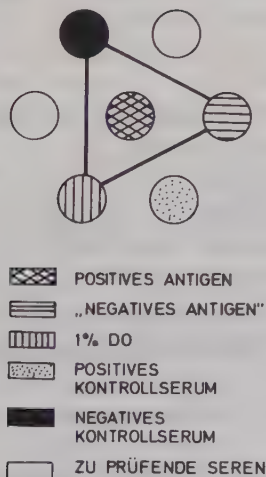
Anschließend wurden die Platten 16-24 Stunden bei  $+37^{\circ}\text{C}$  inkubiert und dann abgelesen.

Das Ablesen der Reaktion erfolgte mit Hilfe einer Lupe auf einem Lichtkasten, der eine seitliche Beleuchtung der Testplatten ermöglichte.

Wurden bei der Übersichtsauswertung Präzipitationslinien ermittelt, dann wurden die Seren, wie in Abb. 2 schematisch dargestellt, mit Kontrollen erneut getestet.

## Abb. 2 :

Schematische Darstellung eines positiven Testserums mit negativen Kontrollen



Die Beurteilung der positiven Reaktion wurde so vorgenommen, daß deutlich sichtbare Präzipitationslinien von geringer Dichte mit + bewertet wurden, stärkere Banden mit ++ und Präzipitationen noch höherer Intensität mit +++.

Bei nicht eindeutigen Reaktionen wurde der Test mehrmals wiederholt.

#### Modifikationen in der Methodik des Präzipitationstestes

1. Neben 0,8 % Agarose in 0,15 M NaCl-Lösung wurden noch 1 % Agarose sowie 0,8 %, 0,9 % und 1 % Difco-Agar erprobt.
2. Vergleichend gegenübergestellt wurden das geschlossene, hexagonale System dem offenen, allgemein üblichen System.
3. Verschiedene Mengen von Agar (7 ml, 8 ml, 9 ml) wurden auf die Plättchen aufgebracht, wodurch sich die Reservoirs für die Seren und für das Antigen vergrößerten.
4. Die Reservoirs wurden nachträglich, durch Einfüllen eines Agartropfens, am Boden verschlossen und die Ergebnisse mit denen beim 1- und 2-maligen Nachfüllen und Nichtnachfüllen verglichen.
5. Vergleichend wurden folgende DO-Antigene erprobt :
  - a. nicht dialysiertes Antigen
  - b. dialysiertes Antigen
  - c. mit Polyäthylenglykol 20 000 bis auf 1/10 des Ausgangsvolumens eingeengt, nicht dialysiertes Antigen
  - d. mit Polyäthylenglykol 20 000 eingeengt, dialysiertes Antigen
  - e. nach der DO-Behandlung nicht mehr zentrifugiertes Antigen
  - f. Antigen, gewonnen durch nochmalige DO-Behandlung des Sedimentes
6. Inaktivierte und nicht inaktivierte Seren wurden vergleichend getestet.

## 2. Untersuchungsergebnisse

### A. Ergebnisse der Antigenherstellung

Die Überprüfung der Antigene auf ihre komplementbindenden und präzipitierenden Eigenschaften mit einem positiven Rinder Serum mit bekanntem Titer hatte folgende Ergebnisse :

#### a. Kochantigen

Bei Kochantigenen, die nach der Herstellung noch ca. 3 Wochen bei  $+4^{\circ}\text{C}$  "reifen" mußten, wurden in der KBR relativ niedrige Titer von durchschnittlich 1:32 - 1:64 erzielt (Tabelle 1). Der höchste KBR-Titer von 1:128 wurde in der Charge 2 erreicht. Die besten Ergebnisse wurden 3 - 4 Wochen nach der Herstellung ermittelt. Längere Lagerzeiten brachten keine weiteren Verbesserungen.

Bei Verwendung des Antigens in der KBR war eine Eigenhemmung in der 1. Verdünnungsstufe (1:2) vorhanden.

Eine 1-2-minütige Behandlung mit Ultraschall erbrachte in der Regel einen Titeranstieg um eine Stufe, wobei es ohne Bedeutung war, ob das Ausgangsmaterial oder das gekochte Antigen beschallt wurde.

Die Trennung der Elementarkörperchen vom Überstand durch hochtourige Zentrifugation (1 h bei 10 000 U/min. in der Phywe-Zentrifuge Pirouette) hatte keinen Einfluß auf die Qualität des "gereiften" Antigens.

Einen Überblick über die Ergebnisse gibt Tabelle 1 :

Tabelle 1 :

| Koch-<br>antigen<br>Charge<br>Nr. | Datum<br>der<br>Herst. | Antigentiter in der KBR am |       |      |      |        |       |
|-----------------------------------|------------------------|----------------------------|-------|------|------|--------|-------|
|                                   |                        | 5.4.                       | 28.4. | 5.5. | 8.5. | 9.5.   | 30.5. |
| 1                                 | 4.4.                   | 1:8                        | 1:16  | 1:16 | 1:32 | 1:64B  | 1:32  |
| 2                                 | 11.4.                  |                            | 1:32  | 1:64 | 1:64 | 1:128B | 1:128 |
| 3                                 | 11.4.                  |                            | 1:32  | 1:32 | 1:16 | 1:32B  | 1:32  |
| 4                                 | 11.4.                  |                            | 1:16  | 1:8  | 1:16 | 1:32B  | 1:16  |
| 5                                 | 15.4.B                 |                            |       | 1:64 | 1:32 | 1:64   | 1:32  |
| 6                                 | 15.4.B                 |                            |       | 1:32 | 1:64 | 1:64   | 1:64  |

Erklärung zu Tabelle 1 : B = Ultraschallbehandlung (1-2 min.)

b. Antigen nach Frigen- und Natriumlaurylsulfatbehandlung

Eine Frigenbehandlung bewirkte lediglich einen erhöhten Reinheitsgrad der behandelten Chlamydiensuspension; eine Wirkung auf die Antigenität der Präparation war nicht festzustellen. Das Behandlungsverfahren mit Natriumlaurylsulfat erbrachte mit und ohne Frigen-Vorbehandlung bzw. mit und ohne Beschallen unter den beschriebenen Bedingungen keine brauchbaren Ergebnisse. Durch keine der angewendeten Natriumlaurylsulfat-Konzentrationen wurde eine Freisetzung von Antigen erreicht.

c. Antigen nach Natriumdesoxycholatbehandlung

Die durch die Desoxycholatbehandlung kombiniert mit Beschallung erzielten KBR-Titer lagen bei der besten Präparation bei 1:512, im Durchschnitt aber bei 1:128 bis 1:256, also zwei bis drei Stufen höher als bei der Kochantigenherstellung.

Als optimal erwies sich die Verwendung von 1 %igem Natrium-desoxycholat in 0,01 M Phosphatpuffer bei einem pH-Wert von 7,2 im Verhältnis 1 Gewichtsteil Sediment : 6 Gewichtsteile DO, bei 45°C 4 h lang geschüttelt. Nach 1-stündiger Klärung bei 12 000 U/min. in der Phywe-Zentrifuge (Pirouette) war das auf diese Weise gewonnene Antigen leicht milchig getrübt und von dünnflüssiger Konsistenz. Es zeigte nach ausreichender Dialyse in der KBR auch in niederen Verdünnungen keine Eigenhemmung.

Hiervon abweichende Versuchsanordnungen mit unterschiedlichen Parametern, wie z.B. veränderte Mischungsverhältnisse und DO-Konzentrationen, andere pH-Werte, andere Temperaturen oder zusätzliche Behandlung mit Trypsin erbrachten schlechtere Ergebnisse, wie aus den folgenden Tabellen zu ersehen ist.

Der Einfluß verschiedener Modifikationen auf die Qualität des DO-Antigens :

Tabelle 2 : Der Einfluß von Ultraschall und Trypsin auf die Qualität des DO-Antigens

| Herstellungsverfahren                                                          | KBR-Titer |          |
|--------------------------------------------------------------------------------|-----------|----------|
|                                                                                | Charge 1  | Charge 2 |
| 1. 1 % DO 1:6, pH 7,2 , 45°C ,<br>4 h schütteln, 2 min. beschallt              | 1:256     | 1:512    |
| 2. 1 % DO 1:6, pH 7,2 , 45°C ,<br>4 h schütteln, <u>nicht</u> beschallt        | 1:128     | 1:256    |
| 3. 1 % DO 1:6, pH 7,2 , Trypsin<br>0,25 % , 45°C , 4 h schütteln,<br>beschallt | 1:256     | 1:128    |
| 4. 1 % DO 1:6, pH 7,2 , Trypsin<br>0,5 % , 45°C , 4 h schütteln,<br>beschallt  | 1:64      | 1:32     |

Für jede Modifikation einer Charge wurde das gleiche Ausgangsmaterial benutzt.

Weitere Modifikationen wurden mit Charge 2 als Ausgangsmaterial durchgeführt.

Tabelle 3 : Der Einfluß der DO-Menge auf die Qualität des Antigens

| Mischungsverhältnis<br>g Sediment / g DO | KBR-Titer |
|------------------------------------------|-----------|
| 1/2                                      | 1:64      |
| 1/4                                      | 1:128     |
| 1/6                                      | 1:256     |
| 1/8                                      | 1:64      |

Tabelle 4 : Der Einfluß des pH-Wertes auf die Qualität des Antigens

| pH-Wert | KBR-Titer |
|---------|-----------|
| 6,0     | 1:128     |
| 7,2     | 1:256     |
| 8,0     | 1:128     |
| 9,0     | 1:32      |

Tabelle 5 : Der Einfluß der Temperatur auf die Qualität des Antigens

| Temperatur | KBR-Titer |
|------------|-----------|
| 20°C       | 1:128     |
| 30°C       | 1:256     |
| 45°C       | 1:256     |

Tabelle 6 : Der Einfluß der mechanischen Bewegung auf die Qualität des Antigens

|                       | KBR-Titer |
|-----------------------|-----------|
| 2 h geschüttelt       | 1:32      |
| 4 h       "           | 1:256     |
| 8 h       "           | +         |
| 4 h nicht geschüttelt | 1:128     |

+ keine antigene  
Aktivität mehr  
nachweisbar

In der Regel wurde bei der Antigenherstellung durch 4-stündiges Schütteln eine nahezu vollständige Freisetzung des löslichen Antigens erzielt. Eine 2. Natriumdesoxycholatbehandlung des Restsedimentes erbrachte anschließend lediglich Antigenpräparationen, die in der KBR Titer von 1:2 bis 1:4 aufwiesen und in der Präzipitation nicht mehr reagierten.

Anders lagen die Verhältnisse, wenn das Antigen während der Einwirkung des Natriumdesoxycholats nicht geschüttelt wurde. In diesem Falle konnte durch eine nochmalige DO-Behandlung des Restsedimentes ein Antigen erzielt werden, das sowohl in der KBR als auch in der Präzipitation gute Ergebnisse erbrachte.

Tabelle 7 : Der Einfluß der Einengung durch Polyäthylenglykol 20 000 auf die KBR-Titer

| Grad der Einengung | Antigen 1 | KBR-Titer<br>Antigen 2 | Antigen 3 |
|--------------------|-----------|------------------------|-----------|
| Ausgangsmaterial   | 1:64      | 1:32                   | 1:64      |
| 1:2                | 1:128     | 1:64                   | 1:128     |
| 1:4                | 1:128     | 1:64                   | 1:128     |
| 1:10               | 1:256     | +                      | 1:256     |

<sup>†</sup>nicht durchgeführt

Die Einengung von DO-Antigen mit Polyäthylenglykol bewirkte keinen linearen Anstieg des KBR-Titers.

Der Einfluß des Prozentgehaltes der DO-Lösung auf die Qualität des Antigens

Die vergleichende Behandlung des Ausgangsmaterials mit 0,5 % DO und 1 % DO erbrachte bei der mit 1 % DO behandelten Präparation ein Antigen (KBR-Titer 1:128), das sich um 4 Titerstufen von dem mit 0,5 % DO behandelten Antigen (KBR-Titer 1:8) unterschied. Bei höheren DO-Konzentrationen ( $\geq 2$  %) fiel die Lösung bei Zimmertemperatur als Gel aus, in dem das Sediment nicht mehr resuspendiert werden konnte.

"Löslichkeit" des Antigens

Die Antigenität des DO-Extraktes blieb nach Sedimentation der Chlamydien-Zellkörper voll erhalten, wie sich im Präzipitationstest durch Verwendung von Präparationen vor und nach hochtouriger Zentrifugation zeigte. Für die KBR war in jedem Fall neben der Entfernung des Natriumdesoxycholats durch Dialyse die Reinigung des Antigens durch hochtourige Zentrifugation erforderlich, da sonst Eigenhemmung des Antigens bis in hohe Verdünnungen auftrat.

### Haltbarkeit des Antigens

Das DO-Antigen zeigte bei Aufbewahrung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  in einem Zeitraum von 4 Monaten keinen Titerabfall.

### B. Ergebnisse in der KBR

#### a. Rinderseren

Die Ergebnisse der Untersuchungen von 1066 Rinderseren in der Komplementbindungsreaktion bei Verwendung des durch Natrium-desoxycholatbehandlung hergestellten Antigens sind in Tabelle 8 zusammengefaßt.

Die vergleichenden Untersuchungen von Seren mit Ornithose-Antigen der Behring-Werke, Marburg, erbrachte übereinstimmende Ergebnisse.

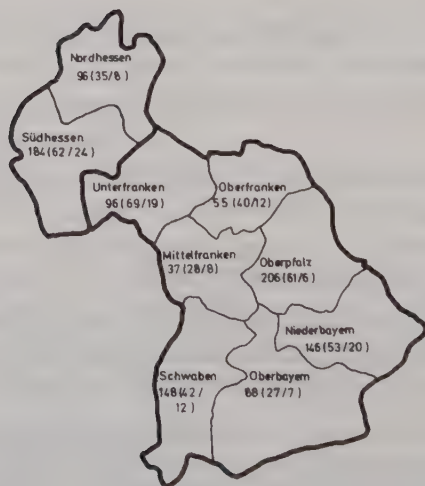
Tabelle 8 : Untersuchung von 1066 Rinderseren auf Chlamydien-Antikörper mit der KBR

| gete-<br>stete  | insg.<br>S. pos. | KBR-Titer |      |      |      |      |      |       |
|-----------------|------------------|-----------|------|------|------|------|------|-------|
|                 |                  | 1:2       | 1:4  | 1:8  | 1:16 | 1:32 | 1:64 | 1:128 |
| 1066            | 417              | 140       | 71   | 90   | 95   | 13   | 6    | 2     |
| Angaben<br>in % | 39,1             | 33,5      | 17,0 | 21,5 | 22,7 | 3,1  | 1,4  | 0,4   |

Die höchsten Titer erreichten die Seren Nr. 333 und 921 mit jeweils 1:128.

Zur Veranschaulichung der Herkunft der gesammelten Seren aus Hessen und dem süddeutschen Raum dient Abb. 3. Die in Klammern stehenden Zahlen geben die Verteilung aller Seren mit einem positiven KBR-Titer (1.Zahl) und der Seren mit einem KBR-Titer von  $\geq 1:16$  (2.Zahl) an.

Abb. 3 : Überblick über Herkunft und Titerhöhe der untersuchten Seren



In den Tabellen 9 und 10 sind die Daten nochmals zusammengefaßt, und die genaue Verteilung auf die Herkunftsländer ist dargestellt.

Tabelle 9 : Aufteilung der Seren nach Herkunftsbereich und KBR-Titerhöhe

| Land               | KBR-Titer                 |                        |      |     |     |     |      |      |      |       |
|--------------------|---------------------------|------------------------|------|-----|-----|-----|------|------|------|-------|
|                    | unter-<br>suchte<br>Seren | davon<br>pos.<br>Seren | in % | 1:2 | 1:4 | 1:8 | 1:16 | 1:32 | 1:64 | 1:128 |
| Nord-<br>hessen    | 96                        | 35                     | 36,4 | 12  | 5   | 10  | 5    | 2    | 1    | /     |
| Süd-<br>hessen     | 184                       | 62                     | 33,1 | 7   | 10  | 33  | 24   | /    | /    | /     |
| Unter-<br>franken  | 96                        | 69                     | 71,8 | 31  | 16  | 3   | 14   | 3    | 2    | /     |
| Ober-<br>franken   | 55                        | 40                     | 72,7 | 15  | 8   | 5   | 7    | 4    | /    | 1     |
| Mittel-<br>franken | 37                        | 28                     | 75,7 | 6   | 4   | 10  | 2    | 2    | 3    | 1     |
| Ober-<br>pfalz     | 206                       | 61                     | 29,6 | 24  | 12  | 19  | 6    | /    | /    | /     |
| Schwaben           | 148                       | 42                     | 28,3 | 14  | 7   | 9   | 12   | /    | /    | /     |
| Nieder-<br>bayern  | 146                       | 53                     | 36,3 | 21  | 7   | 5   | 19   | 1    | /    | /     |
| Ober-<br>bayern    | 88                        | 27                     | 30,6 | 10  | 2   | 8   | 6    | 1    | /    | /     |
| gesamt             | 1066                      | 417                    | 39,1 | 140 | 71  | 90  | 95   | 13   | 6    | 2     |

Tabelle 10 : Verteilung der Seren mit höheren Titern  
als 1:8 nach Herkunftsbereichen

| Land          | unter-<br>suchte<br>Seren | $\geq 1:16$ | in % | Schwer-<br>punkte |
|---------------|---------------------------|-------------|------|-------------------|
| Nordhessen    | 96                        | 8           | 8,3  |                   |
| Südhessen     | 184                       | 24          | 13,0 |                   |
| Unterfranken  | 96                        | 19          | 19,8 | X                 |
| Oberfranken   | 55                        | 12          | 21,8 | X                 |
| Mittelfranken | 37                        | 8           | 21,8 | X                 |
| Oberpfalz     | 206                       | 6           | 2,9  |                   |
| Schwaben      | 148                       | 12          | 8,1  |                   |
| Niederbayern  | 146                       | 20          | 13,6 |                   |
| Oberbayern    | 88                        | 7           | 8,0  |                   |
| insgesamt     | 1066                      | 116         | 10,8 |                   |

Anhand der Tabellen 9 und 10 kann festgestellt werden, daß Chlamydieninfektionen im Zeitraum der Untersuchung offensichtlich gehäuft in Franken vorkamen.

Dies kommt sowohl in den Prozentzahlen positiver Reaktionen als auch in den Prozentangaben von Seren mit höheren KBR-Titern aus Unter-, Mittel- und Oberfranken zum Ausdruck.

b. Schafseren

Die Ergebnisse in der KBR mit den 70 Seren von Schafen einer Problemherde aus Gambach/Wetterau sind in den Tabellen 12 und 13 zusammengefaßt.

Tabelle 12 zeigt die Verteilung der ermittelten Titer auf die Anzahl der untersuchten Seren auf.

In Tabelle 13 kommt der prozentuale Anteil der Seren mit höheren ( $\geq 1:16$ ) und niederen ( $< 1:16$ ) KBR-Titern im Vergleich zu den gesamten negativen und positiven Seren zum Ausdruck.

Tabelle 12 : Verteilung der ermittelten KBR-Titer auf die Anzahl der untersuchten Seren

| unters.<br>Seren | pos.<br>Seren | KBR-Titer |     |     |      |      |      |       |       |
|------------------|---------------|-----------|-----|-----|------|------|------|-------|-------|
|                  |               | 1:2       | 1:4 | 1:8 | 1:16 | 1:32 | 1:64 | 1:128 | 1:256 |
| 70               | 56            | 3         | 7   | 10  | 14   | 10   | 3    | 5     | 4     |

Tabelle 13 : Prozentuale Aufteilung der Seren nach KBR-Titern

| untersuchte<br>Seren | in %              |                   |                             |                                |
|----------------------|-------------------|-------------------|-----------------------------|--------------------------------|
|                      | negative<br>Seren | positive<br>Seren | Seren mit<br>Titer $< 1:16$ | Seren mit<br>Titer $\geq 1:16$ |
| 70                   | 20                | 80                | 28,5                        | 51,5                           |

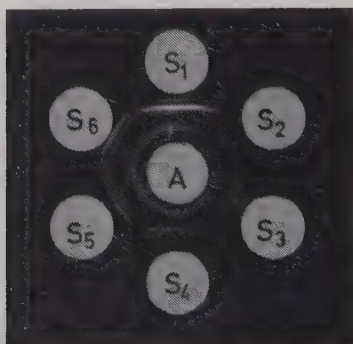
## C. Ergebnisse im Agargelpräzipitationstest

### I. Erprobung der optimalen Technik

1. Für die Untersuchung der Seren wurde 0,8 % Agarose in 0,15 M NaCl-Lösung verwendet, da sich hiermit der Test als am empfindlichsten erwies. Hingegen waren bei Verwendung von 1 % Agarose schärfere Präzipitationslinien zu erreichen, aber nicht die gleiche Empfindlichkeit. Der Vergleich Agar - Agarose ergab ein eindeutiges Plus für die Agarose, in der ausgeprägtere Präzipitationen auftraten.
2. Als ausreichend erwies sich die Verwendung von 7,0 ml Agarose je Plättchen, wenn man die Reservoirs zweimal im Abstand von je 1 h nachfüllte, was sich auf die Präzipitationslinien verstärkend auswirkte.

Ein Verschließen der Seren- und Antigenreservoirs am Boden mit einem Agartropfen erwies sich als nicht nötig.

Abb. 4 : Agargelpräzipitation mit DO-Antigen



$S_1 - S_6$  = Schafseren  
Nr. 1 - 6

A = DO-Antigen

Bei den Seren 1 , 4 und 6 sind zwei Präzipitationslinien erkennbar. Serum 3 zeigt eine Linie, Serum 2 ist negativ. Um das Antigenreservoir ist ein unspezifischer Hof erkennbar.

3. Das auf die beschriebene Weise hergestellte Antigen konnte ohne weitere Vorbehandlung für die Präzipitation verwendet werden. Präzipitationen wurden ausschließlich mit nicht dialysiertem Antigen erzielt.
4. Die Einengung von Antigen mit einem KBR-Titer von 1:128 mit Polyäthylenglykol 20 000 auf 1/10 des Ausgangsvolumens bewirkte keine Verbesserung des Testes, bzw. keine zusätzliche positive Reaktion.
5. Das im Antigen enthaltene Natriumdesoxycholat rief gelegentlich eine schwache unspezifische Präzipitationslinie hervor. Die DO-Linie war jedoch klar von den spezifischen Linien zu unterscheiden. Sie lag nahe dem Antigenreservoir, war relativ kurz und gebogen. Eine derartige, unspezifische Reaktion war bei Wiederholung nicht regelmäßig reproduzierbar.  
Bei positiven oder fraglichen Antigen-Antikörper-Reaktionen wurde deren Spezifität durch Wiederholung des Testes und durch entsprechende Kontrollen (gleichzeitige Präzipitation gegen 1 % DO und Verwendung von positiven Kontrollseren) überprüft.
6. Der Vergleich hexagonales, geschlossenes System gegenüber dem offenen System ergab in meinen Versuchen nicht die Vorteile, wie sie für das hexagonale, geschlossene System in der Literatur (Traavik u.M. 1972) beschrieben wurden. Eine Empfindlichkeitssteigerung konnte durch das geschlossene System nicht erzielt werden.  
Daher wurde aus technischen Gründen das offene System beibehalten.
7. Die Ergebnisse wurden durch Inaktivierung der Seren nicht beeinflusst.

## II. Testergebnisse

### a. Rinderseren

Von den Rinderseren reagierten nur zwei in der Präzipitation positiv, mit der Bildung von je einer Präzipitationslinie. Diese beiden Seren, deren Auswertung in der KBR jeweils einen Titer von 1:128 ergaben, stammten von Tieren aus Franken.

### b. Schafseren

Von den 70 Schafseren aus dem Staatl. Veterinäruntersuchungsamt Frankfurt/M. zeigten 26 Seren (39 %) eine positive Reaktion. Bei mehreren Seren waren bis zu drei Präzipitationslinien zu verzeichnen.

Eine Relation zwischen KBR-Titer und Anzahl der Linien war dahingehend festzustellen, daß nur bei Seren mit einem KBR-Titer von 1:32 und mehr drei Präzipitationslinien aufgetreten waren, wie Tabelle 14 zeigt.

Tabelle 14 : Vergleich der KBR-Titer von Schafseren mit positiver Präzipitation mit der Anzahl der erzielten Präzipitationslinien

| Anzahl der<br>Präz.linien | KBR-Titer |     |      |      |      |       |       | +    | ++      |
|---------------------------|-----------|-----|------|------|------|-------|-------|------|---------|
|                           | 1:4       | 1:8 | 1:16 | 1:32 | 1:64 | 1:128 | 1:256 |      |         |
| 1 Linie                   | 1         | 2   | 1    | 2    | 1    | 1     | 1     | 3/6  | 9(35%)  |
| 2 Linien                  | 1         | 2   | 3    | 1    | 4    | 1     | 1     | 3/10 | 13(50%) |
| 3 Linien                  |           |     |      | 1    | 1    | 1     | 1     | 0/4  | 4(15%)  |

<sup>+</sup> Verhältnis der Anzahl Seren mit niederen und hohen Titern ( $\leq 1:8$  /  $\geq 1:16$ )

<sup>++</sup> Gesamtzahl Seren (Prozentangaben in Klammern)

Von den 26 Seren aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Gießen, die von Routineuntersuchungen stammten, hatten nur zwei einen positiven KBR-Titer. Hier- von war ein Serum mit dem KBR-Titer von 1:32 in der Präzipi- tation positiv. Es bildete eine Linie aus. Die anderen 6 Se- ren von Schafen mit Chlamydienabort, die hohe Titer in der KBR hatten (1:64 bis 1:1024), reagierten alle positiv im Gel- test mit bis zu drei Linien.

Von den 50 Schafseren vom Oberen Hardthof, Gießen, von denen in der KBR nur zwei einen Titer von 1:8 erbrachten, reagier- te kein Serum im Geltest.

Tabelle 15 : Vergleich der KBR-Titer aller Seren mit posi- tiver Präzipitation mit der Anzahl der erziel- ten Präzipitationslinien

| Anzahl<br>d.Präz.<br>linien | KBR-Titer |     |      |      |      |       |       |       |        | +    |
|-----------------------------|-----------|-----|------|------|------|-------|-------|-------|--------|------|
|                             | 1:4       | 1:8 | 1:16 | 1:32 | 1:64 | 1:128 | 1:256 | 1:512 | 1:1024 |      |
| 1 L.                        | 1         | 2   | 1    | 3    | 1    | 4     | 1     | 1     |        | 3/11 |
| 2 L.                        | 1         | 2   | 3    | 1    | 5    | 1     | 2     | 1     |        | 3/13 |
| 3 L.                        |           |     |      | 1    | 1    | 1     | 1     |       | 1      | 0/5  |

<sup>+</sup>Verhältnis der Anzahl Seren mit niederen und höheren Titern ( $\leq 1:8$  /  $\geq 1:16$ )

Abschließend ist festzustellen, daß kein signifikanter Zusam- menhang zwischen der Anzahl der Präzipitationslinien und den KBR-Titern sowie der Stärke der Reaktionen nachzuweisen war (Tabelle 15 und 16). Lediglich die Seren mit drei Präzipi- tationslinien wiesen alle einen Titer von mindestens 1:32 auf. Bei 6 von 35 präzipitierenden Seren lag der KBR-Titer unter 1:16 .

Tabelle 16 : Im Präzipitationstest positive Rinder- und Schafseren

| Seren                | Nr.        | Beurteilung<br>i.d. Präz. | Anzahl<br>d. Linien | KBR-Titer |
|----------------------|------------|---------------------------|---------------------|-----------|
| I. Rinder-<br>seren  | 333<br>921 | +                         | 1                   | 1:128     |
|                      |            | +                         | 1                   | 1:128     |
| II. Schaf-<br>seren  | 13<br>1    | +                         | 1                   | 1:32      |
|                      |            | ++                        | 2                   | 1:64      |
|                      | 2          | +                         | 1                   | 1:128     |
| Gießen               | 3          | ++                        | 2                   | 1:256     |
|                      | 4          | ++                        | 1                   | 1:512     |
|                      | 5          | +++                       | 3                   | 1:1024    |
|                      | 6          | +++                       | 2                   | 1:512     |
| III. Schaf-<br>seren | 13<br>28   | +                         | 1                   | 1:32      |
|                      |            | +                         | 2                   | 1:64      |
|                      | 29         | ++                        | 2                   | 1:64      |
| Ffm                  | 30         | +                         | 2                   | 1:8       |
|                      | 31         | ++                        | 2                   | 1:16      |
|                      | 32         | ++                        | 2                   | 1:4       |
|                      | 33         | +                         | 1                   | 1:128     |
|                      | 34         | +++                       | 1                   | 1:64      |
|                      | 35         | ++                        | 2                   | 1:128     |
|                      | 36         | ++                        | 3                   | 1:128     |
|                      | 37         | ++                        | 2                   | 1:32      |
|                      | 38         | ++                        | 2                   | 1:64      |
|                      | 41         | +                         | 1                   | 1:8       |
|                      | 42         | ++                        | 2                   | 1:8       |
|                      | 43         | +                         | 2                   | 1:64      |
|                      | 44         | +                         | 1                   | 1:4       |
|                      | 47         | +                         | 3                   | 1:64      |
|                      | 48         | +                         | 2                   | 1:16      |
|                      | 49         | +++                       | 3                   | 1:32      |
| 317/5                |            | +                         | 1                   | 1:16      |
| /7                   |            | +                         | 1                   | 1:256     |
| /8                   |            | +                         | 1                   | 1:32      |
| /10                  |            | +                         | 1                   | 1:8       |
| 352/2                |            | ++                        | 3                   | 1:256     |
| /3                   |            | ++                        | 2                   | 1:16      |
| /4                   |            | +                         | 2                   | 1:256     |

#### IV. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die neuere Literatur über das Vorkommen und die Bedeutung von Chlamydien als Krankheitserreger bei den Wiederkäuern gesichtet und zusammengefaßt.

Wesentliche neue Erkenntnisse über Chlamydiosen bei Rind und Schaf sind in den letzten Jahren in den USA, vor allem durch die Arbeitsgruppe um Storz erzielt worden. Soweit aus der Literatur ersichtlich, spielen in den Vereinigten Staaten verschiedene Chlamydiosen mit definierten Krankheitsbildern - wie z.B. der seuchenhafte Abort beim Rind oder die Polyarthrititis der Schafe - in bestimmten geographisch begrenzten Gebieten eine nicht zu unterschätzende Rolle.

Im übrigen wurden in den USA in der jüngsten Zeit zum ersten Mal ursächliche Beteiligungen von Chlamydien bei verschiedenen Infektionen des Nieren-Harnweg-Systems des Menschen beschrieben (Dunlop u.M. 1972, Dunlop u.M. 1972, Oriel u.M. 1972, Darougar u.M. 1972, Richmond u.M. 1972, Vaughan-Jackson u.M. 1972).

In Europa hat in neuerer Zeit insbesondere Blanco Loizelier in Spanien umfangreiche Forschungen über die Verbreitung von Chlamydieninfektionen angestellt.

In der BRD ist die Rolle von Chlamydieninfektionen für das Krankheitsgeschehen beim Rind und bei anderen Haustieren noch weitgehend ungeklärt. Lediglich bei Schafen ist der enzootische Chlamydienabort bei uns eine seit langem bekannte, wichtige Erkrankung, die in bestimmten Gebieten mit vermehrter Schafhaltung hohe Verluste hervorrufen kann.

Neben spezifischen Infektionen spielen heute besonders unter modernen Haltungsbedingungen mehr und mehr auch "Faktorensennen" eine Rolle, bei denen es erst durch das Zusammen-

wirken von mehreren, an sich inapparenten oder alleine wenig belastenden Infektionen zur klinischen Erkrankung kommt. Die Diagnose dieser "Faktorensyndrome" und die Erkennung aller beteiligten Faktoren gestaltet sich jedoch schwierig, wenn nicht einfach durchführbare Testmethoden für alle in Frage kommenden Faktoren vorhanden sind.

Über das Vorkommen von Antikörpern gegen Chlamydien bei den verschiedenen Tierarten und beim Menschen wurde in einer größeren Zahl von Arbeiten aus verschiedenen Ländern berichtet. In der Regel kam für derartige epidemiologische Untersuchungen die Komplementbindungsreaktion zur Anwendung. Meist konnten Chlamydien-Antikörper bei einem hohen Prozentsatz von Individuen einer Population, sowohl beim Menschen als auch bei den verschiedenen Tierarten, nachgewiesen werden. Ihre Anwesenheit ließ jedoch keine Schlüsse auf die Bedeutung dieser Infektionen zu.

Neben den pathogenen Chlamydien-Stämmen, die klinische Erscheinungen verursachen, sind heute auch Stämme bekannt, die schwach pathogen oder apathogen sind. Diese Stämme sind meist im Darmtrakt nachweisbar. Sie können geringgradige Darmaffektionen bewirken oder aber inapparente Infektionen hervorrufen. Kölbl (1967) nennt sie "Kotstämme". Nach Kölbl scheinen aus Schafen isolierte "Kotstämme" eine gewisse Pathogenität für diese Tierart zu besitzen. Schon Storz (1963) war es gelungen, mit solchen Stämmen experimentell bei Schafen neben gelegentlichen Durchfällen auch Aborte hervorzurufen. Dies gelang Kölbl jedoch nicht bei Rindern mit "Kotstämmen" vom Rind. Nach experimenteller Infektion regten jedoch alle verwendeten Stämme die Bildung von Antikörpern an.

Häufig sind bei serologischen Untersuchungen in Tierpopulationen Verfolgungsuntersuchungen bzw. Untersuchungen von Serumpaaren in bestimmten zeitlichen Abständen, die eine Aus-

sage über evtl. Titerbewegungen zulassen, nicht oder nur unter Schwierigkeiten durchführbar. Dagegen stehen in der Regel zur selben Zeit gewonnene Seren mehrerer Tiere eines Bestandes zur Verfügung. Hier lassen sich durch gezielte Auswertung serologische Untersuchungsergebnisse oft überzeugende Aussagen über die Beteiligung eines Erregers am ablaufenden Krankheitsgeschehen in Problembeständen erzielen (Woernle u.M. 1973).

Eine besondere Möglichkeit bietet hierbei die gleichzeitige Anwendung verschiedener serologischer Methoden zur Untersuchung auf das Vorhandensein von Antikörpern, die zu unterschiedlichen Zeiten nach der Infektion nachweisbar sind. Derartige Methoden werden in der Diagnostik der Viruskrankheiten des Geflügels seit langem angewandt.

So ist auch bekannt, daß beim Auftreten eines hohen Prozentsatzes an Reagenten bei Anwendung des Agargelpräzipitationstestes die Infektion in der Regel nicht lange zurückliegt oder daß sie zumindest nicht problemlos abgelaufen ist. Es ist deshalb naheliegend, bei epidemiologischen Untersuchungen neben der Komplementbindungsreaktion gleichzeitig eine derartige Methode einzusetzen.

Zur Untersuchung in der Agargelpräzipitation ist im Gegensatz zur Komplementbindungsreaktion ein lösliches Antigen in hoher Konzentration erforderlich. Eine deutliche Reaktion erfolgt nur bei Anwesenheit von größeren Mengen präzipitierender Antikörper und der im Gleichgewicht dazu stehenden Menge präzipitierenden Antigens.

Schwierigkeiten bei der Herstellung eines derartigen Antigens sind vermutlich der Grund dafür, daß der Geltest bisher keine Anwendung in der Diagnostik von Chlamydieninfektionen beim Tier gefunden hat.

Im experimentellen Teil der vorliegenden Arbeit wurden zunächst verschiedene Antigenherstellungsmethoden überprüft. Als Ausgangsmaterial erwies sich der von Wachendörfer u. Peheim (1962) an die Chorioallantoishöhle adaptierte Stamm 8583 von *Chlamydia ovis* als besonders geeignet. Hier war neben der geringen unspezifischen Absterbequote der Embryonen und der höheren Chlamydienausbeute auch die technische Weiterbearbeitung günstiger als bei Stämmen, die an den Dottersack adaptiert waren.

Gute Ergebnisse erbrachte die Herstellung eines Antigens unter Verwendung von Natriumdesoxycholat. Die bei dieser Methode in der Literatur (Jenkin 1960) beschriebene Trypsinbehandlung konnte, wie vergleichende Versuche ergaben, weggelassen werden. Hingegen bewirkte eine zusätzliche, kurzfristige Behandlung des Ausgangsmaterials mit Ultraschall eine Erhöhung des Antigentiters. Vermutlich lag die Ursache hierfür in einer besseren Freisetzung von Elementarkörperchen aus Eiweißkonglomeraten, wodurch ein direktes Einwirken des Natriumdesoxycholats auf die Elementarkörperchen ermöglicht wurde.

Bei Verwendung des auf die beschriebene Weise gewonnenen Antigens in der Komplementbindungsreaktion traten bei keiner HerstellungschARGE unspezifische Reaktionen auf. Hingegen zeigte "Kochantigen" bei niederen Verdünnungen unspezifische Reaktionen.

Kochantigen erbrachte einen durchschnittlich um 2 bis 3 Stufen niedrigeren Titer als Natriumdesoxycholatantigen in der Komplementbindungsreaktion.

Als nachteilig muß auch die "Reifezeit" des Kochantigens von ca. 3 Wochen angesehen werden, wonach dieses Antigen erst den maximalen Titer erreicht hatte. Präzipitationen konnten mit Kochantigen nicht erzielt werden.

Versuche, durch Behandlung des Ausgangsmaterials mit Natriumlaurylsulfat ein brauchbares Antigen herzustellen, mißlingen. Weder nach den Angaben von Benedict u. O'Brien (1956), noch bei Verwendung verschiedener Konzentrationen von Natriumlaurylsulfat konnte die Freisetzung des löslichen Antigens erzielt werden.

Für die Verwendung des durch Natriumdesoxycholatbehandlung hergestellten Antigens in der Komplementbindungsreaktion war eine Dialyse nötig, um das die Reaktion störende Substrat zu entfernen. Wurde das Antigen aber im Geltest verwendet, durfte dieses nicht dialysiert werden, da sonst keine Reaktion mehr nachzuweisen war. Vermutlich hat das Natriumdesoxycholat die Funktion, den Lipidanteil des gruppenspezifischen Antigens in Lösung zu halten. Dies scheint für die Präzipitationsreaktion von Bedeutung zu sein.

Die Untersuchung der Rinderseren aus Hessen und dem süddeutschen Raum in der Komplementbindungsreaktion bestätigte das weitverbreitete Vorkommen von Antikörpern gegen Chlamydien bei diesen Tieren. Bei 39,1 % der Rinder konnten Chlamydien-Antikörper nachgewiesen werden. Dieser hohe Prozentsatz und das Vorkommen von vorwiegend niederen Titern stimmt mit den aus der Literatur bekannten Angaben über das Auftreten von Chlamydien-Antikörpern in anderen Teilen Deutschlands überein (Bert 1964, Krüger-Hansen-Schoop u. Schoop 1966, Winter u.M. 1970).

Bei Auswertung der Ergebnisse durch Aufschlüsselung der Seren nach Herkunftsgebieten wurde festgestellt, daß die Anzahl der Seren nach Chlamydien-Antikörpern bei Rindern aus Franken um durchschnittlich 100 % höher lag als bei den Seren aus den übrigen Gebieten. Dies muß auf eine stärkere Verseuchung in diesem Gebiet zurückgeführt werden.

Bemerkenswert erscheint auch die Feststellung, daß die beiden Seren mit den höchsten Titern von je 1:128 von Rindern aus Franken stammten. Von allen untersuchten Rinderseren zeigten nur diese beiden Seren eine Reaktion in der Agargelpräzipitation. Es ist anzunehmen, daß bei diesen beiden Tieren das Ergebnis der serologischen Untersuchung im Zusammenhang mit einer klinischen Manifestation einer Chlamydiose stand.

Im allgemeinen jedoch ist offensichtlich den Chlamydieninfektionen beim Rind in den untersuchten Gebieten aufgrund der vorliegenden Ergebnisse und der bisherigen Kenntnisse über den Erreger eine untergeordnete Rolle im Krankheitsgeschehen zuzusprechen. Die vorliegenden Resultate deuten an, daß durch epidemiologische Untersuchungen von Serumproben von Schlachtrindern Hinweise auf eine eventuelle Gefährdung von Rinderbeständen eines bestimmten Gebietes durch Infektion mit Chlamydien erhalten werden können, obgleich komplementbindende Antikörper in einem hohen Prozentsatz aller Tiere gefunden werden. Hierfür sprechen besonders die bei der Untersuchung der Schafseren erzielten Ergebnisse.

Die Beurteilung der Schafseren muß nach ihrer Herkunft getrennt vorgenommen werden.

Bei der Untersuchung der 70 Seren aus der Problemherde in Gambach/Wetterau konnten bei 80 % der Tiere Chlamydien-Antikörper in der Komplementbindungsreaktion nachgewiesen werden. Der Prozentsatz der Seren mit höheren Titern (ab 1:16) lag mit 51,5 % hoch. 39 % der Seren reagierten im Agargeltest mit bis zu 3 Präzipitationslinien. Die gehäuften Aborte waren hier auf eine Infektion mit *Chlamydia ovis* zurückzuführen. Hier sind die Ergebnisse der Komplementbindungsreaktion und des Geltestes beweisend für die Diagnose. Die Befunde lassen aber auch die Aussage zu, daß es sich um ein akutes Infektionsgeschehen handelte.

Erst durch weitere experimentelle Untersuchungen werden exakte Aussagen über das zeitliche Auftreten von komplementbindenden und präzipitierenden Antikörpern bei einer Chlamydieninfektion möglich sein. Hierdurch können zusätzliche Informationen über den zeitlichen Ablauf einer Feldinfektion gewonnen werden.

Von den 26 Seren, die zur Routineuntersuchung an das Institut gesandt worden waren und von denen nur zwei einen positiven Titer in der Komplementbindungsreaktion von je 1:32 aufwiesen, bildete ein Serum im Geltest eine Präzipitationslinie. Bei diesem Tier ist ein direkter Zusammenhang mit einer klinischen Manifestation anzunehmen.

Hohe Titer in der Komplementbindungsreaktion bis zu 1:1024 wurden bei den 6 "Kontrollseren" ermittelt, die von Schafen stammten, die aufgrund einer Infektion mit *Chlamydia ovis* abortiert hatten. Alle 6 Seren reagierten in der Agargelpräzipitation mit der Ausbildung bis zu 3 Linien.

Mit den 50 Schafseren vom Oberen Hardthof, von denen bis auf 2 Seren mit einem Titer von 1:8 alle weiteren in der Komplementbindungsreaktion negativ waren, wurde keine Präzipitation erzielt. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß Chlamydien als Ursache von Aborten zum Zeitpunkt der Untersuchung in dieser Herde kaum in Frage kommen.

Es war keine Korrelation zwischen der Höhe der KBR-Titer und einer positiven Präzipitation festzustellen.

Insgesamt reagierten 17 Schafseren (65,4 %) im Präzipitationstest mit der Ausbildung von 2 oder 3 Linien. Nur Seren mit einem KBR-Titer von mindestens 1:32 bildeten in der Präzipitation 3 Linien aus.

Der Agargelpräzipitationstest erwies sich als eine brauchbare Methode zur Verbesserung der Diagnostik von Chlamydiosen. Er ist technisch einfach durchzuführen und erbringt

auch bei Massenuntersuchungen schnell Ergebnisse.  
Das Antigen ist auf einfache Weise herzustellen. Die Voraussetzung für einen derartigen Test - ein genügend hochtitriges und lösliches Antigen - konnte durch die beschriebene Natriumdesoxycholatbehandlung erfüllt werden. Diese Methode erwies sich als ergiebig und für Routinezwecke leicht durchführbar.

## V. Zusammenfassung

Die neuere Literatur über Chlamydien, insbesondere hinsichtlich ihrer Bedeutung als Krankheitserreger bei Wiederkäuern und hinsichtlich der serologischen Nachweismethoden wurde gesichtet und zusammengefaßt.

Verschiedene Verfahren zur Herstellung eines gruppenspezifischen Chlamydienantigens wurden erprobt. Die Behandlung eines Chlamydienkonzentrates mit Natriumdesoxycholat kombiniert mit einer kurzfristigen Ultrabeschallung erbrachte die besten Ergebnisse.

Insgesamt 1066 Rinderseren aus Hessen, Franken, Schwaben, Unter- und Oberbayern sowie der Oberpfalz wurden in der Komplementbindungsreaktion auf Chlamydien-Antikörper untersucht. 39,1 % aller Seren reagierten positiv, 10,8 % hatten einen Titer von  $\geq 1:16$ .

Bei einer selektiven Auswertung nach Herkunftsländern fällt auf, daß sich die Untersuchungsergebnisse der Seren aus dem fränkischen Raum signifikant von jenen der übrigen Länder abheben. 73 % der Seren aus Franken reagierten in der Komplementbindungsreaktion positiv, 20,7 % wiesen einen Titer von  $\geq 1:16$  auf.

Von allen untersuchten Rinderseren reagierten nur zwei im Geltest mit der Ausbildung einer Präzipitationslinie. Diese beiden Seren stammten von Tieren aus Franken.

Bei diesen beiden, sowohl in der Komplementbindungsreaktion als auch in der Präzipitation positiven Seren, ist ein Zusammenhang zwischen dem serologischen Ergebnis und einer klinischen Manifestation der Chlamydieninfektion anzunehmen.

80 % der Seren einer Schafherde, in der Chlamydienaborte vor- kam, zeigten positive Reaktionen in der Komplementbindungsreaktion (Titer bis 1:256), davon reagierten 51 % mit Titern

von  $\geq 1:16$ . 39 % reagierten im Geltest mit bis zu 3 Linien. Die serologische Untersuchung bestätigt das akute Auftreten des enzootischen Abortes in dieser Herde.

6 weitere Seren von Schafen, die aufgrund einer Chlamydieninfektion abortiert hatten, wiesen hohe Titer in der Komplementbindungsreaktion (1:64 bis 1:1024) auf. Alle reagierten in der Präzipitation mit bis zu 3 Linien.

2 Seren (4 %) aus einer Schafherde mit Verdacht auf Chlamydienabort reagierten in der Komplementbindungsreaktion positiv (Titer jeweils 1:8). In der Präzipitation wurde keine Reaktion erzielt. Der Verdacht des enzootischen Abortes konnte in dieser Herde aufgrund dieser Ergebnisse nicht aufrechterhalten werden.

Alle Seren mit einer positiven Präzipitationsreaktion reagierten auch in der Komplementbindungsreaktion; jedoch lag keine direkte Korrelation zwischen Höhe des KBR-Titers und einer Reaktion im Geltest vor. Es wiesen aber alle Seren, die mit 2 oder 3 Linien präzipitierten, in der Komplementbindungsreaktion einen Titer von  $\geq 1:32$  auf.

Aufgrund der Untersuchungsergebnisse erscheint der Präzipitationstest als eine brauchbare Methode zur Verbesserung der Diagnostik von Chlamydiosen.

Für epidemiologische Untersuchungen ist dieser Test bei gleichzeitiger Anwendung der Komplementbindungsreaktion von besonderer Aussagekraft.

## VI. Literaturverzeichnis

1. Bannister, G.L., Boulanger, P., Rice, C.E.  
Mastitis produced experimentally in a cow with  
an agent of the psittacosis-lymphogranuloma  
group of virus.  
Canad.J.Comp.Med.Vet.Sci. 23: 47-55, 1959
2. Bannister, G.L., Boulanger, P., Gray, V.P., Chapman, C.H.,  
Avery, R.J., Corner, R.H.  
Sporadic bovine encephalomyelitis in Canada.  
Canad.J.Comp.Med. 26: 25-32, 1962
3. Barron, A.L. & Collins, A.R.  
Studies on trachoma agent by double gel  
preparation.  
Amer.J.Ophthalmol. 63: 1487-1491, 1967
4. Barron, A.L., Castle, P.G., Paul, B., Page, L.A.  
Detection of Chlamydia antibodies in animal  
sera by double diffusion in gel.  
Appl.Microbiol. 23: 770-774, 1972
5. Bedson, S.P. & Western, G.T.  
A disease of parrots communicable to man.  
Rep.Pub.Health and Mes.Subj. 61: 59, 1930
6. Bedson, S.P. The use of complement-fixing reactions in  
the diagnosis of human psittacosis.  
Lancet 229: 1277-1288, 1935
7. Bedson, S.P. Observations bearing on the antigenic compo-  
sition of the psittacosis virus.  
Brit.J.Exp.Path. 17: 109-117, 1936
8. Bedson, S.P., Barwell, C.F., King, E.J., Bishop, L.W.  
Laboratory diagnosis of lymphogranuloma  
venereum.  
J.Clin.Path. 2: 241-249, 1949
9. Beer, J. Untersuchungen an und mit komplementbindenden  
Antigenen des Virusabortes der Schafe.  
Zbl.Vet.Med. 5: 305-328, 1958



18. Blanco Loizelier, A.  
Isolation of psittacosis-lymphogranuloma  
venereum agents. II. From bovine mastitis.  
Rev.Patr.Biol.Anim. 13: 179-186, 1969
19. Blanco Loizelier, A.  
Infectious ovine abortions.  
Rev.Patr.Biol.Anim. 15: 277-298, 1971
20. Blanco Loizelier, A.  
Diagnosis of animal chlamydial infections by  
immunofluorescence.  
Rev.Patr.Biol.Anim. 15: 313-323, 1971
21. Blanco Loizelier, A.  
Bovine chlamydial infection.  
Rev.Patr.Biol.Anim. 15: 325-347, 1971
22. Blyth, W.A. & Taverne, J.  
Some consequences of the multiple infection  
of cell cultures by TRIC organisms.  
J.Hyg. 70: 33-37, 1972
23. Breed, R.S., Murray, E.G.D., Smith, N.R.  
Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.  
Baltimore, Williams and Wilkins, 1957
24. Brumpt, E. Rickettsia intracellulaire Stomacale de  
Culex Fatigans.  
Ann.Parasit. 16: 153-158, 1938
25. Collins, A.R. & Barron, A.L.  
Demonstration of Group- and Species-specific  
Antigens of Chlamydia Agents by Gel Diffusion.  
J.Infect.Dis. 121: 1-8, 1970
26. Conant, R.M., Barron, A.L., Milgrom, F.  
Gel precipitation with ECHO 4 and other  
enteroviruses.  
Proc.Soc.Exper.Biol.Med. 121: 307-311, 1966

27. Corner, A.H., Bannister, G.L., Hill, D.P.  
A histological study of the effects of  
enzootic abortion of ewes virus in the  
lactating bovine mammary gland.  
Can.J.Comp.Med. 32: 372-377, 1967
28. Crocker, T.T. & Bennett, B.M.  
The slope assay for measurement of lethal  
potency of meningo-pneumonitis virus in  
the chick embryo.  
J.Immunol. 75: 239-248, 1955
29. Csontos, L. & Szeky, A.  
Über das Vorkommen der sporadischen bovinen  
Encephalomyelitis in Ungarn.  
Nord.Vet.Med. 16: 95-99, 1964
30. Cutlip, R.C., Smith, P.C., Page, L.A.  
Chlamydial polyarthrititis of lambs: A review.  
J.A.V.M.A. 161: 1213-1216, 1972
31. Cutlip, R.C. & Ramsey, F.K.  
Ovine chlamydial polyarthrititis: Sequential  
development of articular lesions in lambs  
after intraarticular exposure.  
Amer.J.Vet.Res. 34: 71-75, 1973
32. Darougar, S., Jones, B.R., Kinnison, J.R., Vaughan-Jackson, J.D.,  
Dunlop, E.M.C.  
Chlamydia infection: Advances in the diagnostic  
isolation of Chlamydia, including TRIC agent,  
from the eye, genital tract, and rectum.  
Brit.J.vener.Dis. 48: 416-420, 1972
33. Dawson, C.R., Ostler, H.B., Hanna, L., Hoshiwara, I. Jawetz, E.  
Tetracyclines in the treatment of chronic  
trachoma in America Indians.  
J.Infect.Dis. 124: 255-263, 1971
34. Dhir, S.P., Kenny, G.E., Grayston, J.T.  
Characterization of group antigen of Chlamydia.  
Infect.& Immunity 4: 725-730, 1971

35. Dhir, S.P., Hakomori, S., Kenny, G.E., Grayston, J.T.  
Immunochemical studies on chlamydial group antigen of A 2-keto-3-deoxycarbohydrate as immunodominant group.  
J.Immunol. 109: 116-122, 1972
36. Dickinson, L. & Cooper, B.S.  
Contagious conjunctivo-keratitis of sheep.  
J.Path.Bact. 78: 257-266, 1959
37. Doughri, A.M., Altera, K.P., Storz, J.  
Host cell ranges of the chlamydial infections in the neonatal bovine gut.  
J.Comp.Path. 83: 107-114, 1973
38. Doughri, A.M., Altera, K.P., Storz, J., Eugster, A.K.  
Electron microscopic tracing of pathogenetic events in intestinal chlamydial infections of newborn calves.  
Exper.and Mol.Pathol. 18: 10-17, 1973
39. Dunlop, E.M.C., Vaughan-Jackson, J.D., Darougar, S. Jones, B.R.  
Chlamydia infection: Incidence in 'nonspecific' urethritis.  
Brit.J.vener.Dis. 48: 425-428, 1972
40. Dunlop, E.M.C., Vaughan-Jackson, J.D., Darougar, S.  
Chlamydia infection: Improved methods of collection of material for culture from the urogenital tract and rectum.  
Brit.J.vener.Dis. 48: 421-424, 1972
41. Durand, A., Nicolas, J., Favre, M.  
Lymphogranulomatosse inguinale subaigue d'origine g nitale, peut-être v n rienne.  
Bull.Soc.Med.Hop.Paris 35: 274-279, 1913
42. Dyml, B.  
Isolation of an virus of the psittacosis-lymphogranuloma group from cattle with infectious kerato-conjunctivitis.  
Vet.Med.Praha 7: 358-392, 1965

43. Eugster, A.K., Joyce, B.K., Storz, J.  
Immunofluorescence studies on the pathogenesis  
of intestinal chlamydial infections in calves.  
Inf. and Imm. 2: 351-359, 1970
44. Eugster, A.K., Ball, L., Carroll, E.J., Storz, J.  
Experimental genital infections of bulls and  
rams with chlamydial agents.  
Proc. 6th Int. Meeting Dis. Cattle, Phila.,  
Aug. 1970
45. Eugster, A.K. & Storz, J.  
Pathogenic events in intestinal chlamydial  
infections leading to polyarthrititis in calves.  
J. Infect. Dis. 123: 41-50, 1971
46. Evans, A. The development of TRIC organisms in cell  
cultures during multiple infection.  
J. Hyg. 70: 39-48, 1972
47. Fraser, C.E.O. & Berman, D.T.  
Type-specific antigens in the psittacosis-  
lymphogranuloma venereum group of organisms.  
J. Bact. 89: 943-947, 1965
48. Fraser, C.E.O.  
Analytical serology of the Chlamydiaceae.  
In Kwapinski, J.B.G. (Ed.): Analytical serology  
of microorganisms.  
New York, Wiley, 1969, pp. 257-329
49. Francis, R.D. & Gordon, F.B.  
Cultivation of viruses of the psittacosis  
group in the allantoic cavity of chick  
embryos.  
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 59: 270-272, 1945
50. Friis, R.R. Interaction of L cells and Chlamydia  
psittaci: Entry of the parasite and host  
responses to its development.  
J. Bact. 110: 706-721, 1972
51. Gogolak, F.M.  
The mouse erythrocyte hemagglutinin of  
feline pneumonitis virus.  
J. Infect. Dis. 95: 220-225, 1954

52. Gogolak, F.M. & Ross, M.R.  
The properties and chemical nature of the  
psittacosis virus hemagglutinin.  
Virology 1: 474-496, 1955
53. Gössler, R., Leyk, W., Hünermund, G.  
Serologische Untersuchungen bei Rindern im  
Einzugsgebiet von Kabete (Kenia)  
I. Mitteilung: Vorkommen von Antikörpern gegen  
Parainfluenza-3-, IBR-, BVD-Virus, Chlamydien  
und Coxiella brunetti.  
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 86: 164-166, 1973
54. Gordon, F.B. & Quan, A.L.  
Occurrence of Glycogen in inclusions of the  
psittacosis-lymphogranuloma venereum-trachoma  
agents.  
Infect. Dis. 115: 186-196, 1965
55. Goret, H. Biol. Medica 50: 251, 1961
56. Grimes, J.E., Moore, R.W., Grumbles, L.C.  
Agglutinating antigen from an ornithosis  
agent. I. Preparation method and tests with  
turkey serums.  
Avian Dis. 10: 342-347, 1966
57. Grimes, J.E., Grumbles, L.C., Moore, R.W.  
Complement-fixation and hemagglutination  
antigens from a chlamydia agent grown in cell  
cultures.  
Can. J. Comp. Med. 34: 256-260, 1970
58. Gyulai, E., Morrissey, L.P., Labzoffsky, N.A.  
A method for preparation of an group specific  
psittacosis antigen for use in the complement  
fixation test.  
Arch. gesamt. Virusforschung 28: 63-67, 1969
59. Haig, D.A. & Hillmann, M.R.  
Hemagglutination by meningopneumonitis virus  
and its inhibition by immune sera.  
Fred. Proc. 9: 383, 1950

60. Harrison, M.J.  
Conditions for growth of an ovine Chlamydia (Bedsonia) in cell culture.  
Aust.J.exp.Biol.med.Sci. 50: 447-466, 1972
61. Harshfield, H.G.  
Sporadic bovine encephalomyelitis.  
J.Amer.Vet.Med.Ass. 156: 466-477, 1970
62. Hencner, Z. & Parnas, J.  
Experimentelle Untersuchungen über Miyagawanellen; Ornithose, Psittakosis, Lymphogranuloma venerei und Abortus ovis.  
Zbl.Bakt.(Orig.) 204: 80-89, 1967
63. Henneberg, G. & Jordanski, H.  
Haemagglutinations-Hemmtest (HAH) zur Diagnose der Ornithose-Psittakose.  
Zbl.Bakt.(Orig.) 197: 432-437, 1965
64. Henneberg, G., Jordanski, H., Kaufmann, H., Antoniadis, G.  
Experimente mit Miyagawanellen Haemagglutinin und Haemagglutinationshemmtests.  
Zbl.Bakt.(Orig.) 200: 325-347, 1966
65. Hidiroglou, M. & Provost, R.  
Quelques observations sur la Sterilité des Bovins Occasionnée par un Virus du Groupe Psittacose.  
Rec.Med.Vet. 135: 259-260, 1959 (zit. Storz 1971)
66. Higashi, N. The mode of reproduction of the psittacosis-lymphogranuloma-trachoma (PLT).  
Int.Rev.Exp.Path. 3: 35-63, 1964
67. Hillmann, M.R.  
Immunological studies of the psittacosis-lymphogranuloma group of viral agents.  
J.Infect.Dis. 76: 96-114, 1945
68. Hillmann, M.R. & Nigg, C.  
Studies on lymphogranuloma venereum complement-fixing antigens.  
J.Immunol. 53:201, 1946

69. Hillmann, M.R., Haig, D.A., Helmold, R.J.  
The indirect complement fixation, hemagglutination and conglutination complement absorption test for viruses of the psittacosis-lymphogranuloma venereum group.  
J.Immunol. 66: 115-130, 1951
70. Inaba, Y., Omori, T., Ishii, S., Matumoto, M.  
Miyagawanella: Psittacosis-lymphogranuloma group of viruses. 3. Hemagglutination of psittacosis virus.  
Jap.J.Exp.Med. 28: 225-242, 1958
71. Jawetz, E., Rose, L., Hanna, L., Thygeson, P.  
Experimental inclusion conjunctivitis in man.  
J.A.M.A. 194: 620-632, 1965
72. Jenkin, H.M.  
Preparation and properties of cell walls of the agent of meningopneumonitis.  
J.Bact. 80: 639-647, 1960
73. Jenkin, H.M., Ross, M.R., Moulder, J.W.  
Species-specific antigens from the cell walls of the agents of meningopneumonitis and feline pneumonitis.  
J.Immunol. 86: 123-127, 1961
74. Jenkin, H.M. & Hung, S.C.  
Effect of Vancomycin on the growth of psittacosis-trachoma agents cultivated in eggs and cell culture.  
Appl.Microbiol. 15: 10-12, 1967
75. Jones, H., Rake, G., Stearns, B.  
Studies on lymphogranuloma venereum.  
II. The action of the sulfonamides on the agent on lymphogranuloma venereum.  
J.Infect.Dis. 76: 55-69, 1945
76. Kawakami, Y., Kaji, T., Sugimura, K., Omori, T., Matumoto, M.  
Miyagawanella: Psittacosis-Lymphogranuloma group of viruses. V. Isolation of a virus from feces of naturally infected sheep.  
Bull.Natl.Inst.Animal Health 36: 77-84, 1958

77. Kiuchi, M. & Inaba, Y.  
Study on so-called 'bovine influenza'.  
Exp. Rep. Gov. Exper. Stan. Anim. Hyg. Tokyo  
25: 37-42, 1952
78. Kölbl, O.  
Vorläufiger Bericht über Miyagawanellöse-  
Untersuchungen bei Rindern in Österreich.  
Wien. Tierärztl. Monat. 54: 591-606, 1967
79. Kölbl, O. & Psota, A.  
Miyagawanellen-Isolierung bei Polyarthritiden,  
Pneumonie, Encephalomyelitis und inter-  
stitieller Herdnephritis der Kälber.  
Wien. Tierärztl. Monat. 55: 443-445, 1968
80. Konrad, J. & Bohac, J.  
Encephalomyelitis in cattle.  
Vet. Cas. 8: 228-238, 1959
81. Kraljevic, Z.  
Untersuchungen zur Haltbarkeit von Miyagawa-  
nella ovis und Miyagawanella psittaci bei  
-70°C sowie ihre Lokalisation und Konzentra-  
tion im embryonierten Hühnerei.  
Med. Vet. Inaug. Diss. Gießen 1968
82. Krauss, H., Wandera, J.G., Lauer mann, L.H.  
Isolation and identification of Chlamydia in  
Kenya Sheep and serologic survey.  
Am. J. Vet. Res. 32: 1433-1437, 1971
83. Kunin, C.M. & Tupasi, T.  
Non-antigen-antibody precipitin reaction  
observed with Dextran Sulfate, DEAE-Dextran,  
AB, Proteins and Phospholipids.  
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 133: 858-861, 1970
84. Kuo, C.C., Kenny, G.E., Wang, S.P.  
Trachoma and psittacosis antigens in agar  
gel double immunodiffusion.  
Excerpta medica 113-123, 1971

85. Kuo, C., Wang, S., Wentworth, B.B., Grayston, J.T.  
Primary isolation of TRIC organisms in HeLa  
229 cells treated with DEAE-Dextran.  
J.Infect.Dis. 125: 665-668, 1972
86. Labzoffsky, R.P.  
Rapid agglutination test as a possible aid  
in the laboratory diagnostic of ornithosis.  
J.Infect.Dis. 79: 96-100, 1946
87. Levinthal, W.  
Die Ätiologie der Psittakose.  
Klin.Wschr. 9: 654, 1930
88. Levaditi, J., Roger, F., Destombes, P.  
Tentative de Classification des Chlamydiaceae  
(Rake 1955) tentant compte de leurs affinités  
tissulaires et de leur epidemiologie.  
Ann.Inst.Pasteur 5: 656-662, 1964
89. Lewis, V.J., Thacker, W.L., Cacciapuoti, A.F.  
Detection of Chlamydia psittaci by immuno-  
fluorescence.  
Appl.Microbiol. 24: 8-12, 1972
90. Lewis, V.J., Thacker, W.L., Engelman, H.M.  
Indirect hemagglutination test for Chlamydia  
antibodies.  
Appl.Microbiol. 24: 22-25, 1972
91. Lillie, L.D.  
Psittacosis: Rickettsia-like inclusion in  
man and in experimental animals.  
Pub.Hlth.Rep. 45: 773-778, 1930
92. Lin, H.S. & Moulder, J.W.  
Patterns of response to sulfadiazine,  
D-cycloserine and D-alanine in members of  
the psittacosis group.  
J.Infect.Dis. 116: 372-376, 1966

93. Littlejohn, I.R., Harris, A.N.A., Harding, W.B.  
Sporadic bovine encephalomyelitis.  
Aust.Vet.J. 37: 53-54, 1961
94. Litwin, J. The growth cycle of the psittacosis group  
of microorganisms.  
J.Infect.Dis. 105: 129-160, 1959
95. Litwin, J., Officer, J.E., Brown, A., Moulder, J.W.  
A comparative study of the growth cycles  
of different members of the psittacosis  
group in different host cells.  
J.Infect.Dis. 109: 251-279, 1961
96. Mariott, M.E. & Storz, J.  
The behavior of psittacosis agents of diverse  
origin and extreme antigenic structure in  
the chicken chorioallantois.  
Zbl.Bakt.(Orig.) 200: 304-323, 1966
97. Mason, D.M.A.  
A capillary tube agglutination test for  
detection of antibodies against ornithosis  
in turkey serum.  
J.Immunol. 83: 661-666, 1959
98. Matsumoto, A. & Manire, G.P.  
Electron microscopic observations on the  
effects of Penicillin on the morphology of  
Chlamydia psittaci.  
J.Bact. 101: 278-285, 1970
99. Matumoto, M., Otori, T., Morimoto, T., Harada, H., Inaba, Y.,  
Ishii, S.  
Studies on the disease of cattle caused by  
a psittacosis-lymphogranuloma group virus.  
Jap.J.Exp.Med. 25: 223-245, 1955
100. Mendlowski, B. & Segre, D.  
Polyarthrititis in sheep.  
Amer.J.Vet.Res. 21: 68-73, 1960
101. Mendlowski, B. & Segre, D.  
Purification of the virus of ovine abortion  
and its use in agglutination test.  
Amer.J.Vet.Res. 25: 627-645, 1963

102. Menges, R.W., Harshfield, G.S., Wenner, H.A.  
Sporadic bovine encephalomyelitis.  
Amer.J.Hyg. 57: 1-14, 1953
103. Meyer, K.F. The ecology of psittacosis and ornithosis.  
Medicine 21: 175-206, 1942
104. Mitscherlich, E.  
Der Virusabort des Schafes in Deutschland.  
Dt.Tierärztl.Wschr. 61: 42-44, 1954
105. Mitscherlich, E.  
Beiträge zum Virusabort des Schafes.  
Vet.Med.Nachrichten 1: 1-15, 1955  
3: 3-19, 1955
106. Mitsui, Y., Fujimoto, M., Kajima, M.  
Development and morphology of trachoma agent  
in the yolk sac cell as revealed by electron  
microscopy.  
Virology 23: 30-45, 1964
107. Møller Christensen, P. & Volkert, M.  
The complement-fixing antigens from infected  
yolk sacs. II. The nature of the virus anti-  
gen and its relation to the phosphatide  
antigen.  
Acta path.microbiol.scand. 37: 219-224, 1955
108. Møller Christensen, P.  
Ornithosis, a study of a virus and antigen.  
Acta path.microbiol.scand. 118: 110- 114, 1957
109. Morrison, S.J. & Jenkin, H.M.  
Growth of Chlamydia psittaci strain meningo-  
pneumonitis in mouse L cells cultivated in  
a defined medium in spinner cultures.  
In vitro 8: 94-100, 1972
110. Moulder, J.W., Ruda, J., Colon, J.I., Greenland, R.M.  
The effect of passage with chloramphenicol  
upon the behavior of penicillin-resistant  
feline pneumonitis virus during subsequent  
passage with penicillin.  
J.Infect.Dis. 102: 186-201, 1958

111. Moulder, J.W.  
The biochemistry of intracellular parasitism.  
Chicago, University of Chicago, 1962, 84-127
112. Moulder, J.W.  
The psittacosis group as bacteria  
John Wiley & Sons, Inc. New York, 1964, 1-95
113. Moulder, J.W.  
The relation of the psittacosis group to  
bacteria and viruses.  
Ann. Rev. Microbiol. 20: 107-130, 1966
114. Moulder, J.W.  
A model for studying the biology of parasitism:  
Chlamydia psittaci and mouse fibroblasts.  
Bio. Science 19: 875-881, 1969
115. Moulder, J.W.  
Glucose metabolism of L cells before and after  
infection with Chlamydia psittaci.  
J. Bact. 104: 1189-1196, 1970
116. Murray, E.S.  
Guinea pig inclusion conjunctivitis virus.  
I. Isolation and identification as a member  
of the psittacosis-lymphogranuloma-trachoma  
group.  
J. Infect. Dis. 114: 1-12, 1964
117. McKercher, D.G.  
Comments on psittacosis-lymphogranuloma-  
agents in bovine pneumonia.  
J. Amer. Vet. Med. Ass. 152: 819-821, 1968
118. McNutt, S.H.  
A preliminary report on an infectious  
encephalomyelitis of cattle.  
Vet. Med. 35: 228-231, 1940
119. McNutt, S.H. & Waller, E.F.  
Sporadic bovine encephalomyelitis.  
Cornell Vet. 40: 437-448, 1940

120. Nichols, R.L., McComb, D.E., Haddad, N., Murray, E.S.  
Studies on trachoma. II. Comparison of  
fluorescent antibody, Giemsa, and egg iso-  
lation methods for detection of trachoma  
virus in human conjunctival scrapings.  
Amer.J.Trop.Med.Hyg. 12: 223-229, 1963
121. Nitzschke, E. & Rott, R.  
Untersuchungen über den Einfluß von Cystein  
auf die Haltbarkeit des Psittacosevirus und  
des Virus der klassischen Geflügelpest.  
Monat.Tierheilk. 9: 279-285, 1957
122. Nitzschke, E., Dicke, B., Priegler, R.  
Untersuchungen über die Verbreitung von In-  
fektionen mit verschiedenen Virusarten (MD/VD,  
IBR/IPV, PI 3, Enterovirus) und Bedsonia in  
den Rinderbeständen von Rheinland-Pfalz.  
TU 12: 597-608, 1971
123. Novilla, M.N. & Jensen, R.  
Placental pathology of experimental enzootic  
abortion in ewes.  
Amer.J.Vet.Res. 31: 1983-1999, 1970
124. Officer, J.E. & Brown, A.  
Growth of psittacosis virus in tissue culture.  
J.Infect.Dis. 107: 283-299, 1960
125. Omori, T., Ishii, S., Matumoto, M.  
Miyagawanellosis in Japan.  
Amer.J.Vet.Res. 21: 564- 573, 1960
126. Oriel, J.D., Reeve, P., Miller, A., Nicol, C.S.  
Chlamydia infection: Isolation of Chlamydia  
from patients with non-specific genital in-  
fection.  
Brit.J.vener.Dis. 48: 429-436, 1972
127. Page, I.A. & Bankowski, R.A.  
Factors affecting the production and detection  
of antibodies in turkeys infected with orni-  
thosis.  
Amer.J.Vet.Res. 21: 971-978, 1960

128. Page, L.A. Revision of the family Chlamydiaceae Rake (Rickettsiales): Unification of the psittacosis-lymphogranuloma-venereum-trachoma group of organisms in the genus Chlamydia Jones, Rake and Stearns, 1945.
129. Page, L.A. Proposal for the recognition of two species in the genus Chlamydia.  
Int.J.Systematic Bact. 18: 51-66, 1968
130. Page, L.A., Matthews, P.J., Smith, P.C.  
Natural intestinal infection with Chlamydia psittaci in a closed bovine herd: serologic changes, incidences of shedding, antibiotic treatment of the herd, and biologic characteristics of the Chlamydia.  
Amer.J.Vet.Res. 34: 611-614, 1973
131. Palmer, E.L., Martin, M.L., Hierholzer, J.C., Ziegler, D.W.  
Nonspecific precipitation of serum proteins by Sodium Lauryl Sulfate in agar diffusion and immunoelectrophoresis.  
Appl.Microbiol. 21: 903-906, 1971
132. Palotay, J.L. & Christensen, N.R.  
Bovine respiratory infections.  
I. Psittacosis-lymphogranuloma venereum group of viruses as etiological agents.  
J.A.V.M.A. 134: 222-230, 1959
133. Papadopoulos, O. & Leontides, S.  
Mastitis produced experimentally in sheep with an ovine abortion Chlamydia.  
Zbl.Vet.Med. B 19: 655-665, 1972
134. Parikh, G. & Shechmeister, I.L.  
Interaction of meningopneumonitis virus with white blood cells.  
Virology 22: 177-185, 1964
135. Popovici, V.  
A study on respiratory and digestive Miyagawanella infections in cattle.  
Nord.Vet.Med.Suppl.I. 65-70, 1964

136. Popovici, V., Cirstet, I., Coman, I.  
Isolation of micro-organisms of the Bedsonia group from calves.  
Arch.Vet.(Bukarest)An.II.Tom.III, Fasc.I, 61-66, 1966
137. Rake, G., McKee, C.M., Shaffer, M.F.  
Agent of lymphogranuloma venereum in the yolk sac of the developing chick embryo.  
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 43: 332-335, 1940
138. Rake, G.  
The lymphogranuloma-psittacosis group.  
Ann. N.Y. Acad.Sci. 56: 557-560, 1953
139. Reeve, P. & Taverne, J.  
Strain differences in the behavior of TRIC agents in cell cultures.  
Amer.J.Ophthalm. 63: 1167/141-1173/147, 1967
140. Richmond, S.J., Hilton, A.L., Clarke, S.K.R.  
Chlamydia infection: Role of Chlamydia Sub-group A in non-gonococcal and postgonococcal urethritis.  
Brit.J.vener.Dis. 48: 437-444, 1972
141. Riera, M.C. & Barron, A.L.  
Reactions with hemagglutinin of psittacosis agents in gel diffusion.  
P.S.E.B.M. 135: 594-597, 1970
142. Roots, E. & Rott, R.  
Ein Beitrag zur Reindarstellung des Psittakose-Virus durch Behandlung mit Trypsin.  
Zbl.Vet.Med. 4: 261-264, 1957
143. Roots, E. & Rott, R.  
Herstellung eines hochwertigen komplementbindenden Antigens aus gereinigtem Psittakose-Virus.  
Zbl.Bakt.I (Orig.) 172: 29-36, 1958
144. Roots, E. & Schmitt diel, E.  
Herstellung eines komplementbindenden Psittakosevirus-Antigens durch mechanische Aufschließung der Elementarkörperchen.  
Zbl.Vet.Med. (Orig.) 183: 318-324, 1961

145. Ross, M.R. & Borman, E.K.  
Direct and indirect fluorescent-antibody techniques for the psittacosis-lymphogranuloma venereum-trachoma group for agents.  
J.Bact. 85: 851-858, 1963
146. Schababerle, H.  
Untersuchungen zur Miyagawanellenmastitis.  
Vet.Med.Inaug. München 1965
147. Schliesser, Th.  
Schnellnachweis für Coxiellen.  
In: Jahresbericht für die Frauenhoferges. 1972
148. Schoene, W. Abort- und Sterilitätsfälle beim Rind unter besonderer Berücksichtigung des Pilzabortes und der Miyagawanelleninfektion.  
TU 26: 265-274, 1971
149. Schoop, G. & Kauker, E.  
Infektion eines Rinderbestandes durch ein Virus der Psittakosis-Lymphogranuloma-Gruppe.  
Gehäufte Aborte im Verlauf der Erkrankung.  
Dt.Tierärztl.Wschr. 63: 223-235, 1956
150. Schoop, G. Verbreitung und Bedeutung der Infektion mit einem Virus der Psittakosis-Lymphogranuloma-Gruppe bei Rindern.  
Dt.Tierärztl.Wschr. 69: 121-123, 1962
151. Schoop, G., Krüger-Hansen, U., Wachendörfer, G.  
Zur Isolierung von Miyagawanellen aus abortierten Rinderfeten.  
Zbl.Vet.Med. 12: 25-32, 1965
152. Schoop, G., Wachendörfer, G., Krüger-Hansen-Schoop, U., Berger, J.  
Erfahrungen mit einer Lebendvakzine zur Bekämpfung des Miyagawanellenabortes der Schafe.  
Zbl.Vet.Med. 15: 209-223, 1968
153. Sever, J.L. Application of a microtechnique to viral serological investigations.  
J.Immunol. 88: 320-329, 1962

154. Smith, P.C., Cutlip, R.C. & Page, L.A.  
Pathogenicity of a strain of Chlamydia  
psittaci of bovine intestinal origin for  
neonatal calves.  
Am.J.Vet.Res. 34: 615-618, 1973
155. Stamp, J.T., McEwen, A.D., Watt, J.A.A., Nisbet, D.J.  
Enzootic abortion in ewes. I. Transmission  
of the disease.  
Vet.Rec. 62: 251-254, 1950
156. Stamp, J.T., Watt, J.A.A., Cockburn, R.B.  
Enzootic abortion in ewes. II. Complement  
fixation test.  
J.comp.Path. 62: 93-101, 1952
157. Stearns, T.W. & McNutt, S.H.  
Sporadic bovine encephalomyelitis: Filtration  
of the causal agent.  
Amer.J.Vet.Res. 3: 253-257, 1942
158. Stelzner, A., Liuss, W., Schaaf, P., Christner, A., Urbach, H.  
Struktur und Transformation der Ornithose-  
Erreger.  
Zbl.Bakt.(Orig.) 215: 115-122, 1970
159. Stelzner, A., Urbach, H.  
Serologische und seroepidemiologische Unter-  
suchungen über komplementbindende Chlamydia-  
Antikörper.  
Ein Beitrag zum Verständnis der Ornithose.  
Zbl.Bakt.(Orig.) 223: 381-397, 1973
160. St.George, T.D.  
The isolation of Chlamydiae from faeces of  
sheep in Australia.  
Austr.Vet.J. 47: 74, 1971
161. Storz, J. Chlamydia and Chlamydia-Induced Diseases  
Charles C. Thomas, Springfield, Illinois,  
USA 1971
162. Storz, J., McKercher, D.G., Howarth, J.A., Straub, O.C.  
The isolation of a viral agent from epizootic  
bovine abortion.  
J.A.V.M.A. 137: 509-514, 1960

163. Storz, J. & McKercher, D.G.  
Etiological studies on epizootic bovine abortion.  
Zbl.Vet.Med. 9: 411-427, 1962
164. Storz, J., Shupe, J.L., James, L.F., Smart, R.A.  
Polyarthrititis of sheep in the intermountain region caused by a psittacosis-lymphogranuloma agent.  
Amer.J.Vet.Res. 24: 1201-1206, 1963
165. Storz, J., Smart, R.A., Shupe, J.L.  
Virusbedingte Polyarthrititis bei Kälbern.  
3rd Intern. Meeting on Disease of Cattle  
Kopenhagen, Nord.Veterinärmed. 16: 109-115, 1964
166. Storz, J. & Thornley, W.R.  
Serologische und aetiologische Studien über die intestinale Psittakose-Lymphogranuloma-Infektion der Schafe.  
Zbl.Vet. 13: 14-24, 1966
167. Storz, J., Smart, R., Mariott, M.E., Davis, R.V.  
Polyarthrititis of calves: Isolation of psittacosis agents from affected joints.  
Amer.J.Vet.Res. 27: 633-641, 1966
168. Storz, J., Pierson, R.E., Mariott, M.E., Chow, T.L.  
Isolation of psittacosis agents from follicular conjunctivitis of sheep.  
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 125: 857-860, 1967
169. Storz, J., Carroll, E.J., Ball, L., Faulkner, L.C.  
Isolation of a psittacosis agent from semen and epididymis of bulls with seminal vesiculitis syndrome.  
Amer.J.Vet.Res. 29: 549-555, 1968
170. Storz, J., Eugster, A.K., Altera, K.P., Olander, H.J.  
Behavior of different bovine chlamydial agents in newborn calves.  
J.Comp.Path.Therap. 81: 299-307, 1971

171. Storz, J., Collier, J.R., Eugster, A.K., Altera, K.P.  
Intestinal bacterial changes in Chlamydia-  
induced primary enteritis of newborn calves.  
Ann. New York Acad. Sci. 176: 162-175, 1971
172. Tamura, Y., Matsumoto, A., Higashi, N.  
Purification and chemical composition of  
reticulate bodies of meningopneumonitis  
organisms.  
J. Bact. 93: 2003-2008, 1967
173. Tamura, A. & Manire, G.P.  
Effect of penicillin on the multiplication  
of meningopneumonitis organisms (Chlamydia  
psittaci).  
J. Bact. 96: 875-880, 1968
174. Tamura, A., Matsumoto, A., Manire, G.P., Higashi, N.  
Electron microscopic observations on the  
structure of envelopes of mature elementary  
bodies and developmental reticulate forms of  
Chlamydia psittaci.  
J. Bact. 105: 355-360, 1971
175. Tanami, Y. & Yamada, Y.  
Miniature cell formation in Chlamydia psittaci.  
J. Bact. 114: 408-412, 1973
176. Terzin, A.L., Vedros, N.A., Dressler, H.R.  
Studies on a common Bedsonia group antigen  
(CBA) found in the yolk of hens' eggs.  
J. Immunol. 92: 665-672, 1964
177. Traavik, T., Siebke, J.C., Kjeldsberg, E.  
A sensitive modification of the Ouchterlony  
technique detection of hepatitis associated  
antigen by immunodiffusion in a closed hexa-  
gonal system.  
Acta path. microbiol. scand. 80: 773-774, 1972
178. Tribby, J.J.E.  
Cell wall synthesis by Chlamydia psittaci  
growing in L cells.  
J. Bact. 104: 1176-1188, 1970

179. Tribby, J.J.E., Friis, R.R., Moulder, J.W.  
Effect of Chloramphenicol, Rifampicin, and Nalidixic Acid on Chlamydia psittaci growing in L cells.  
J.Infect.Dis. 127: 155-163, 1973
180. Vaughan-Jackson, J.D., Dunlop, E.M.C., Darougar, S., Dwyer, R.St., Jones, B.R.  
Chlamydia infection: Results of tests for Chlamydia in patients suffering from acute Reiter's disease compared with results of tests of the genital tract and rectum in patients with ocular infection due to TRIC agent.  
Brit.J.vener.Dis. 48: 445-451, 1972
181. Vedros, N.A.  
Species-specific antigens from trachoma and inclusion-conjunctivitis (Chlamydia) agents.  
J.Immunol. 99: 1183-1186, 1967
182. Volkert, M. & Møller Christensen, P.  
Two ornithosis complement-fixing antigen from infected yolk sacs.  
I. The phosphatide antigen, the virus antigen and method for their preparation.  
Acta path.microbiol.scand. 37: 211-218, 1955
183. Wachendörfer, G. & Peheim, E.  
Zur Züchtung des Schafabortvirus im bebrüteten Hühnerei. Die Kultur des Virus in der Chorioallantoishöhle.  
Mh.Tierhkde. 14: 220-224, 1962
184. Wachendörfer, G.  
Zur Verwendung des Agargeltestes in der Virologie.  
Habilitationsschrift Frankfurt/M. 1964
185. Wang, S. & Grayston, J.T.  
Immunologic relationship between genital TRIC, lymphogranuloma venereum, and related organisms in a new microtiter indirect immunofluorescence test.  
Amer.J.Ophthalmol. 70: 367-374, 1970

186. Weiss, E. & Dressler, H.R.  
Investigation of the stability of trachoma agent.  
Ann.N.Y.Acad.Sci. 98: 250-260, 1962
187. Weiss, E. Comparative metabolism of rickettsiae and other host dependent bacteria.  
Zbl.Bakt.(Orig.) 206: 292-298, 1968
188. Wenner, H.A., Harshfield, G.S., Chang, T.W., Menges, R.W.  
Sporadic bovine encephalomyelitis.  
II. Studies on the etiologie of the disease, isolation of nine strains of an infectious agent from naturally infected cattle.  
Amer.J.Hyg. 57: 15-29, 1953
189. White, G. Experimental production of pneumonia in calves by infection with an organism of the psittacosis-lymphogranuloma group.  
Vet.Rec. 77: 1124-1126, 1965
190. White, G., Withnell, C.G., Pittfield, N.  
The complement fixation test as an indicator of Bedsonia respiratory infection in cattle.  
Vet.Rec. 87: 790-793, 1970
191. Wilson, M.R. & Dungworth, D.L.  
Psittacosis-lymphogranuloma-venereum group viruses in sheep. Comparison between a faecal and an enzootic abortion strain.  
J.Comp.Path.Therap. 73: 277-284, 1963
192. Wilson, M.W. & Pringle, B.H.  
Experimental studies of agar-plate precipitin-test of Ouchterlony.  
J.Immunol. 73: 232-243, 1964
193. Wilson, M.R.  
The differentiation of some psittacosis-lymphogranuloma venereum group agents isolated from sheep and cattle.  
J.Infect.Dis. 116: 319-323, 1966
194. Wilson, M.R. & Thomson, R.G.  
Chlamydia pneumonia of calves.  
Res.Vet.Sci. 9: 467-473, 1968

195. Winter, J., Beer, J., Marwitz, H.  
Untersuchung über die Bedeutung von Bed-  
sonien bei Respirationserkrankungen der  
Kälber und Jungrinder.  
Arch.Exper.Vet.Med. 24: 1347-1363, 1970
196. Woernle, H., Brunner, A., Kußmaul, K.F.  
Serologische Diagnose von Parainfluenza-2-,  
Parainfluenza-3-, Mucosal-Disease-, Adeno-  
Virus und Chlamydien-Infektionen sowie der  
infektiösen Rhinotracheitis des Rindes.  
TU 28: 319-326, 1973
197. Yalpa, M. Das Verhalten des Schafabortvirus im embryo-  
nierten Hühnerei sowie im Versuch an Mäusen  
und Meerschweinchen.  
Med.Vet.Inaug.Diss. Gießen 1959
198. Yilmaz, S. & Mitscherlich, E.  
Erfahrungen bei der Bekämpfung des enzooti-  
schen Abortes der Schafe mit einer Lebend-  
vakzine aus dem abgeschwächten Chlamydia  
ovis-Stamm "P".  
Berl.Münch.Tierärztl.Wschr. 86: 361-366, 1973
199. York, C.J. & Baker, J.A.  
A new member of the psittacosis-lympho-  
granuloma group of viruses that causes  
infection in calves.  
J.Exp.Med. 93: 587-604, 1951
200. Young, S., Parker, H.D., Firehammer, B.D.  
Abortion in sheep due to a virus of the  
psittacosis-lymphogranuloma group.  
J.Amer.Vet.Med.Ass. 133: 374-379, 1958

Herrn Professor Dr. H. Krauss danke ich für die Überlassung des Themas sowie für die jederzeit gewährte Unterstützung bei der Durchführung und Abfassung der Arbeit.

Allen Mitarbeitern des Institutes möchte ich herzlich danken für die erhaltene Hilfe und für die zahlreichen Anregungen bei der Durchführung der Arbeit.

## L e b e n s l a u f

Am 26. Mai 1944 wurde ich, Manfred Breinl, als Sohn des Arztes Dr. W. Breinl und seiner Ehefrau Hermine, geb. Pfeifer in Böhmisches-Kamnitz, CSSR, geboren.

Von 1950 bis 1955 besuchte ich die Volksschule in Ober-Widdersheim, anschließend bis 1965 das Gymnasium in Nidda.

Im Wintersemester 1965 begann ich mein Studium an der Veterinärmedizinischen Fakultät der Justus Liebig-Universität Gießen und legte im Januar 1972 die letzte Prüfung des Tierärztlichen Examens ab.







